

**ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ INHIBITRICE DE NOUVELLES β -LACTAMINES
CONTRE LES BACTÉRIES À GRAM NÉGATIF ET POSITIF**

par

Évelyne Lacasse

Mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, 28 mai 2020

Le 28 mai 2020

*le jury a accepté le mémoire de Madame Évelyne Lacasse
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur François Malouin

Directeur de recherche

Département de biologie

Professeur Vincent Burrus

Évaluateur interne

Département de biologie

Professeur Kamal Bouarab

Président-rapporteur

Département de biologie

SOMMAIRE

L'augmentation de la prévalence des infections causées par des microorganismes multirésistants pèse sur la conscience des scientifiques depuis longtemps. S'il y a quelques décennies une nouvelle molécule antibiotique était découverte tous les dix ans, ce n'est plus le cas aujourd'hui. Parmi les découvertes notables se retrouvent les β -lactamines. Les molécules composant cette classe d'antibiotiques agissent en inhibant avec plus ou moins d'affinité les *penicillin-binding proteins* (PBPs). Ces enzymes sont responsables de la formation du peptidoglycane (PG) ; une structure essentielle pour le maintien de l'intégrité bactérienne. Leur efficacité, leur basse toxicité et leur large spectre d'activité envers plusieurs espèces bactériennes en font les antibiotiques de première ligne pour le traitement de multiples infections dans le monde. Or, cette surutilisation entraîne l'augmentation du nombre de molécules antibiotiques maintenant devenues inefficaces à la suite du développement de résistances bactérienne et force la recherche de nouvelles alternatives. Deux stratégies ont été explorées dans ma maîtrise afin de revaloriser les β -lactamines : l'amélioration des propriétés pharmacodynamiques et la conjugaison à un sidérophore pour augmenter leur entrée chez les bactéries à Gram négatif.

Premièrement, les résultats présentés dans ce mémoire démontrent la liaison du tébipénème-pivoxil-hydrobromate (TBPM-PI-HBr) aux PBPs de différents microorganismes d'importance clinique. Le tébipénème-pivoxil, la prodrogue du tébipénème, est déjà approuvée pour utilisation clinique au Japon et constitue la seule carbapénème pouvant être administrée oralement. Présentement, la compagnie Spero Therapeutics Inc. optimise sa formulation pour augmenter son accumulation dans les reins comme alternatives aux fluoroquinolones dans le traitement d'infections urinaires compliquées. L'objectif est son approbation pour utilisation clinique en Amérique du Nord. Cependant, certains tests, dont la caractérisation de la liaison aux PBPs chez les microorganismes cibles (*Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*), manquaient. Les tests d'affinité aux PBPs ont été effectués grâce à une molécule fluorescente reportrice, la Bocillin FL (BoFL). Pour ces microorganismes, la PBP2 était la cible principale

menant à l'élargissement des cellules dû à un peptidoglycane déficient. *Pseudomonas aeruginosa*, aussi testé, montrait une inhibition double des PBP2 et PBP3, alors que *Staphylococcus aureus* voyait sa PBP1 inhibée avec la meilleure affinité. L'ajout des mesures de concentrations minimales inhibitrices et les phénotypes observés en microscopie en contraste de phase ont permis de broser un portrait global de l'activité *in vitro* du tébipénème. Les résultats appuient la continuation des études pour l'obtention d'une homologation pour usage clinique.

La deuxième partie du mémoire présente un profil d'inhibition de conjugués sidérophore- β -lactamines (SID- β L). Ces molécules, qui pourraient constituer une nouvelle classe d'antibiotique, permettent de surmonter l'imperméabilité des membranes externes des bactéries à Gram négatif (Gram-) par l'utilisation des transporteurs de fer spécifiques au sidérophore. En camouflant l'antibiotique sur un sidérophore, la β -lactamine est internalisée et rejoint les PBPs situées dans le périplasme. Les SID- β L exploitent donc le métabolisme essentiel du fer, afin de revaloriser certaines β -lactamines. Dans ce mémoire un bis-catéchol (sidérophore) est lié soit à l'ampicilline, au céfaclor ou au loracarbef (toutes des β -lactamines) et un bis-catéchol-mono-hydroxamate (sidérophore) est lié au céfaclor. Ces conjugués n'ont pas entraîné de bénéfices contre la bactérie à Gram positif (Gram+) *S. aureus* qui ne possède pas de barrière de perméabilité. Cependant, le bis-catéchol-ampicillin s'est avéré efficace contre *P. aeruginosa*. Il était le seul conjugué actif contre cette espèce, alors que tous les conjugués étaient actifs contre *A. baumannii*. Contre *K. pneumoniae* et *E. coli*, les conjugués les plus actifs étaient les bis-catéchol-loracarbef/céfaclor. Ce profil d'inhibition démontre la spécificité qu'entraîne la conjugaison à un sidérophore et établit la preuve qu'il est possible de surmonter des mécanismes de résistance intrinsèques aux Gram- grâce au système de transport du fer.

Mots clés : β -lactamines, tébipénème, *penicillin-binding proteins*, imperméabilité membranaire, sidérophore, transport du fer, multirésistance.

REMERCIEMENTS

La réalisation de ces projets n'aurait pas été possible sans l'accueil et les conseils de mon directeur de recherche. Le Pr. François Malouin m'a offert une place au sein de son équipe, en hiver 2017, et m'a permis de grandir en tant que scientifique et de développer une expertise avec les essais de liaison aux PBPs.

Je remercie aussi mes conseillers, le Pr. Vincent Burrus et Pr. Kamal Bouarab pour leur temps et leur écoute. De nos discussions sont sorties plusieurs idées d'expérimentation qui m'auront été très utiles.

Ensuite, une atmosphère motivante est toujours plus productive. Je remercie donc les membres de mon laboratoire et en particulier Eric Brouillette, Audrey Larose, Guillaume Millette pour votre support et votre aide, ainsi que toutes les autres personnes qui se sont senties impliquées de près ou de loin dans ma vie lors de mes deux années de maîtrise

Les deux parties de mon projet n'auraient pu se réaliser sans nos collaborateurs. Je remercie donc Spero Therapeutic Inc. pour une partie du financement de recherche et pour avoir permis de présenter mes résultats au congrès de l'*American Society for Microbiology*. Je remercie aussi le Pr. Marvin Miller pour la synthèse des conjugués sidérophore- β -lactamines et pour ses conseils pour la réalisation des expériences.

Finalement, ce projet n'aurait pu avoir lieu sans le financement des organismes subventionnaires pour la recherche et pour mes bourses d'étude provenant des Fonds de recherche du Québec en nature et technologies (FRQNT), du Conseil de recherche en sciences naturelles et génie du Canada (CRSNG), ainsi que l'Université de Sherbrooke.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iv
REMERCIEMENTS	vi
LISTES DES ABRÉVIATIONS.....	ix
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTES DES FIGURES	xiii
CHAPITRE 1 INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1 Les β-lactamines et la montée de la multirésistance	1
1.1.1 Le Groupe <i>ESKAPE</i>	2
1.2 Les différentes classes de β-lactamines	3
1.2.1 Les pénicillines.....	4
1.2.2 Les céphalosporines.....	4
1.2.3 Les monobactames	5
1.2.4 Les carbapénèmes.....	5
1.3 L'activité inhibitrice des β-lactamines.....	7
1.3.1 L'assemblage du peptidoglycane.....	7
1.3.2 Les <i>pencillin-binding proteins</i>	9
1.3.3 L'activité enzymatique des PBPs	10
1.3.4 L'inhibition des PBPs par les β -lactamines.....	12
1.4 Les mécanismes de résistance et les défis cliniques	14
1.4.1 Le mode d'action des β -lactamases	15
1.4.2 Les thérapies combinées avec inhibiteurs de β -lactamases.....	19
1.5 Le futur développement des β-lactamines	21
1.5.1 La venue d'une nouvelle carbapénème orale	21
1.5.2 Les conjugués sidérophore- β -lactamine	24
1.5.3 La régulation de l'import du fer	27
1.6 Hypothèses et objectifs de la recherche	29
CHAPITRE 2 ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	30
2.1 Introduction de la publication.....	30

2.1.1 Originalité et contribution à la science	30
2.1.2 Contribution des auteurs	31
2.2 <i>In Vitro</i> Activity of Tebipenem (SPR859) Against Penicillin-Binding Proteins of Gram-negative and Gram-positive Bacteria	32
2.2.1 Abstract.....	33
2.2.2 Methods, results and discussion	33
2.2.3 Acknowledgments	41
2.2.4 References	42
2.2.5 Supplemental material	45
CHAPITRE 3 L'ACTIVITÉ INHIBITRICE DE CONJUGUÉS SIDÉROPHORE-β-LACTAMINE	50
3.1 Matériel et méthodes	50
3.1.1 Antibiotiques et composés	50
3.1.2 Les souches bactériennes	50
3.1.3 Les milieux de culture.....	51
3.1.4 Les courbes de croissance	51
3.1.5 Les tests de concentrations minimales inhibitrices.....	52
3.2 Résultats	52
3.2.1 Les courbes de croissance	52
3.2.2 Le profil d'inhibition des espèces bactériennes.....	54
3.2.2.1 Ampicilline vs. Bis-catéchol-ampicilline	54
3.2.2.2 Loracarbef/céfaclor vs. Bis-catéchol-loracarbef/céfaclor	56
3.2.2.3 Céfaclor vs. mixte-céfaclor	56
CHAPITRE 4 DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE	58
4.1 L'activité inhibitrice de SPR859	58
4.2. L'activité inhibitrice des conjugués sidérophore-β-lactamine	61
4.3 Conclusion et perspectives	64
BIBLIOGRAPHIE.....	66

LISTES DES ABRÉVIATIONS

PBPs	<i>Penicillin-binding proteins</i>
PG	Peptidoglycane
TBPM-PI-HBr	Tébipénème-pivoxil hydrobromate
BoFL	Bocilline fluorescente
SID-βL	Sidérophore-β-lactamine
Gram-	Gram négatif
Gram+	Gram positif
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Enterobacter spp</i>
CRE	<i>Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae</i>
OMS	Organisation mondiale de la santé
6-APA	acide 6-aminopenicillanique
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
DHP-I	Déhydropeptidase-I
F6P	Fructose-6-phosphate
NacGlu-6P	N-acétylglucosamine-6-phosphate
UDP-NacGlu	Uridine-diphosphate N-acétylglucosamine

UDP-NacMur	Acide uridine-diphosphate N-acétylmuramique
C55-UNDP	C55-undécaprényl-pyrophosphate
Méso-dap	Acide méso-diaminopimélique
ASPRE	<i>active-site serine penicillin recognizing enzymes</i>
IC ₅₀	Concentration inhibant 50% des cibles antibiotique
ESBLs	<i>Extended-spectrum β-lactamases</i>
S β L	Serine- β -lactamase
M β L	Métallo- β -lactamase
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (États-Unis)
I β L	Inhibiteurs de β -lactamases
DBOs	Diazabicyclooctanes
PEPTI	<i>Peptide transporter 1</i>
OATP	<i>Organic anion transporting polypeptides</i>
CMI	Concentration minimale inhibitrice
RDTB	Récepteur dépendant à TonB
EROs	Espèces réactives à l'oxygène
FhuA	<i>Ferric hydroxamate uptake receptor</i>
FepA	<i>Ferrienterobactine receptor</i>

Cir	<i>Colicin-I receptor</i>
FecA	<i>Fe³⁺ dicitrate transport protein</i>
Fur	<i>Ferric uptake regulator</i>
SID	Sidérophore
cUTI	<i>Complicated urinary tract infection</i>
PK/PD	<i>Pharmacokinetics and pharmacodynamics</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
TSA	<i>Tryptone soya agar</i>
MHBCA	<i>Mueller-Hinton Broth cation adjusted</i>
MHBCA-DF	<i>Mueller-Hinton Broth cation adjusted-Déplété en fer</i>
DO	Densité optique

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE

Tableau 1	Récapitulatif des inhibiteurs des SβLs et MβLs	20
-----------	--	----

CHAPITRE 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE

Tableau 2	Binding of antibiotics to PBPs of Gram-negative bacteria	36
-----------	--	----

Tableau 3	Binding of antibiotics to PBPs of <i>S. aureus</i> ATCC 29213 and MRSA 67-0	40
-----------	---	----

LISTES DES FIGURES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE

Figure 1.	Proportion des antibiotiques utilisés chaque année et incidence des infections causées par un microorganisme résistant en 2018 au Canada.	2
Figure 2.	Représentation des différentes classes de β -lactamines.	6
Figure 3.	Schéma de la formation du peptidoglycane des bactéries à Gram+ (<i>S. aureus</i>) et Gram- (<i>E. coli</i>).	8
Figure 4.	Schéma des réactions de transpeptidation et de carboxypeptidation effectuées par les PBPs.	10
Figure 5.	Schéma d'une réaction de transglycosylation effectuée par une PBP.	11
Figure 6	Formule de la réaction enzymatique générale des PBPs.	12
Figure 7.	Schéma adapté de la classification des β -lactamases.	16
Figure 8.	Comparaison schématique simplifiée des réactions enzymatiques impliquant les β -lactamines.	17
Figure 9.	Schéma moléculaire de la prodrogue tébipénème-pivoxil et de la forme active tébipénème.	23

Figure 10.	Schéma du transport des sidérophores et des sidérophores conjugués à une β -lactamine chez les bactéries à Gram–.	25
------------	---	----

Figure 11.	Schéma des quatre conjugués sidérophore- β -lactamine.	27
------------	--	----

CHAPITRE 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE

Figure 12.	PBP binding competition assay between Bocillin FL and SPR859 (a) or meropenem (b) using <i>E. coli</i> K12 cell membranes.	37
------------	--	----

Figure 13.	Microscopy of <i>E. coli</i> K12 (a) and <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (b) incubated with 1×MIC of the indicated antibiotics, for 4 h.	39
------------	--	----

Figure S1.	PBP binding competition assay between Bocillin FL and SPR859 (a) or meropenem (b) using <i>K. pneumoniae</i> 13883 cell membranes.	45
------------	--	----

Figure S2.	PBP binding competition assay between Bocillin FL and SPR859 (a) or meropenem (b) using <i>P. aeruginosa</i> 27853 cell membranes.	46
------------	--	----

Figure S3.	PBP binding competition assay between Bocillin FL and SPR859 (a) or meropenem (b) using <i>S. aureus</i> ATCC 29213 membranes.	47
------------	--	----

Figure S4.	Microscopy of <i>S. aureus</i> ATCC 29213 (a) and MRSA 67-0 (b) incubated with 1×MIC of the indicated antibiotics, for 4 h.	48
------------	---	----

Figure S5.	PBP2a binding competition assay between Bocillin FL and meropenem, SPR859 or oxacillin using MRSA 67-0 membranes pre-incubated with clavulanic acid.	48
------------	--	----

CHAPITRE 3 : L'ACTIVITÉ INHIBITRICE DE CONJUGUÉS SIDÉROPHORE- β -LACTAMINE

Figure 14. Influence de la concentration de Fe^{3+} ($\mu\text{g/mL}$) sur la croissance bactérienne. 53

Figure 15. Activité inhibitrice des conjugués SID- β L. 55

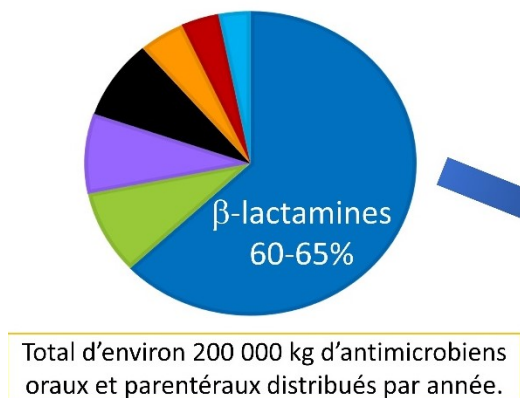
CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

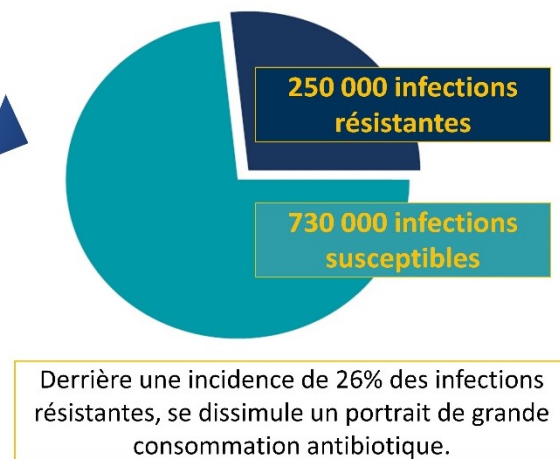
1.1 Les β -lactamines et la montée de la multirésistance

C'est en 1929 qu'Alexander Fleming rapporte l'observation d'une zone de lyse bactérienne autour d'une moisissure qui avait poussé sur une gélose oubliée (Fleming, 1929). Dix ans plus tard, c'est avec l'aide de Howard Walter Florey et Ernst Boris Chain que la pénicilline G a pu être enrichie, sa structure définie et que les premiers essais chez l'humain ont pu être menés (Chain et al., 1940). La souche de *Penicillium* auparavant identifiée *notatum*, puis *chrysogenum* a finalement, à l'aide de la phylogénie moderne, été identifiée comme étant *Penicillium rubens* (Houbraken et al., 2011). Dédiée d'abord au traitement des militaires, la fin de la 2^e guerre mondiale permettra d'étendre son utilisation à la population et, ainsi, compléter et supplanter le salvarsan et les sulfanilamides distribués depuis les années 1930 (Zaffiri et al., 2012). En très peu de temps, différentes β -lactamines seront isolées, en commençant par la pénicilline, les céphalosporines, les carbapénèmes, puis les monobactames (Mohr, 2016). Au Canada, les β -lactamines restent les antibiotiques les plus prescrits avec une utilisation de plus de 60% comparativement à toutes les autres classes antibiotiques existantes (voir figure 1) (Agence de la santé publique du Canada. Système Canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens-Rapport de 2018). Ce pourcentage d'utilisation peut aussi s'observer mondialement pour le traitement de bon nombre d'infections. Malheureusement, une surutilisation entraîne aussi la sélection de bactéries résistantes et la transmission de gènes de résistances, rendant impossible l'action de certaines β -lactamines et forçant la recherche et le développement constant de nouvelles molécules (Durand et al., 2019). Ce mémoire fait état de cette problématique par l'évaluation de l'activité *in vitro* de deux nouvelles β -lactamines : une nouvelle carbapénème pouvant être administrée oralement (1) et une stratégie de revalorisation par la conjugaison à un sidérophore afin de surpasser l'imperméabilité des membranes des bactéries à Gram- (2). Les résultats présentés ici visent à améliorer notre compréhension de

Proportion des antibiotiques prescrits en médecine humaine au Canada



Proportion des infections résistantes sur 980 000 infections bactériennes en 2018



Adapté: du rapport du Système Canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens, 2016.

Adapté: Conseil des académies canadiennes, 2019. *Quand les antibiotiques échouent*. Ottawa (ON).

Figure 1. Proportion des antibiotiques utilisés chaque année et incidence des infections causées par un microorganisme résistant en 2018 au Canada. Ici, est mis en parallèle, la problématique de la surconsommation des antibiotiques et d'un exemple de la montée de la multirésistance que cela entraîne. Le premier diagramme circulaire est largement dominé par les β-lactamines (■), suivi des macrolides (■), des quinolones (■), du triméthoprim/sulfaméthoxazole (■), d'autres (■), des tétracyclines (■) et des lincosamides (■). Le deuxième diagramme montre que 26% des infections bactériennes, en 2018, étaient causées par des microorganismes résistants aux antibiotiques de première ligne.

l'interaction des β-lactamines avec leurs protéines cibles et la possibilité d'exploiter le transport du fer bactérien pour étendre leur action inhibitrice à des espèces multirésistantes.

1.1.1 Le Groupe *ESKAPE*

La multirésistance bactérienne est un phénomène menaçant. De plus en plus de microorganismes causant des infections cliniques possèdent une multitude de gènes de

résistance. Dans la communauté scientifique ceux-ci sont référés sous l'acronyme ESKAPE : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter* spp. (Rice, 2008 ; Boucher et al., 2009). Les deux premiers sont deux bactéries à Gram+, alors que les autres sont à Gram-. Pour ce mémoire, les organismes d'intérêts seront *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* *P. aeruginosa*, qui sont inclus dans l'acronyme ESKAPE, ainsi qu'*Escherichia. coli*. Cette dernière espèce (tout comme *K. pneumoniae*) est plutôt liée au *carbapenem-resistant-Enterobacteriaceae* (CRE) un groupe de microorganismes réfractaires aux traitements antibiotiques de première et parfois de dernier recours (World Bank, 2017 ; Ventola, 2015). *A. baumannii* est un pathogène capable d'acquérir facilement des gènes de résistance étrangers et plusieurs souches sont résistantes aux carbapénèmes (Fournier et al., 2006). *P. aeruginosa* s'adapte facilement et développe plusieurs mécanismes de résistance rapidement. *S. aureus* est reconnu pour les souches résistantes à la méthicilline (SARM). Bien qu'il soit commensal, il s'agit d'un pathogène opportuniste pouvant engendrer toutes sortes d'infections graves qu'il soit résistant ou non (Centers for disease control and prevention (CDC). Diseases and Organisms in Healthcare Settings (7 octobre 2019) [en ligne]). Plusieurs de ces organismes sont classés selon leur résistance aux antibiotiques d'importance critique par L'Organisation mondiale de la santé (OMS) (World Health Organization, 2017). Une résistance à ceux-ci est dénominateur bien souvent d'une multirésistance bien plus vaste.

1.2 Les différentes classes de β -lactamines

Tout d'abord, les β -lactamines sont divisées en quatre classes principales. Les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames ont d'abord été isolées de microorganismes avant que leur structure soit manipulée pour étendre leur spectre d'activité et leurs propriétés pharmacocinétiques/pharmacodynamiques (Demain and Elander, 1999).

1.2.1 Les pénicillines

D'abord, les classes de pénicillines sont composées du même squelette de base. Celui-ci est l'acide 6-aminopénicillanique (6-APA) qui est composé du cycle β -lactame (retrouvé dans toutes les molécules de la classe des β -lactamines), ainsi que du cycle thiazolidine (voir figure 2). C'est la variation des chaînes latérales rattachées par la fonction amine au cycle β -lactame qui modifie l'activité et l'affinité des dérivés de la pénicilline (Demain and Elander, 1999; Lobanovska and Pilla, 2017). À la suite de l'isolation de la pénicilline G en 1942, on remarque vite des agents pathogènes résistants à ce composé. Ce qui entraînera la recherche et la découverte d'une seconde génération de pénicillines, celles résistantes aux pénicillinases (méthicilline, oxacilline, nafcilline, etc.) dans les années 50 (Sidell et al., 1963). La troisième génération de pénicilline, les aminopénicillines comprenant des molécules comme l'ampicilline et l'amoxicilline ont un spectre élargi face aux bactéries à Gram-, ainsi qu'un meilleur potentiel thérapeutique dû à une meilleure solubilité et absorption dans l'organisme (Sutherland, 1964; Watkins and Bonomo, 2017). La dernière génération de pénicilline découverte compte les carboxypénicillines (ticarcilline et carbenicilline) et les ureidopénicillines (piperacilline) développées pour contrer les bactéries naturellement résistantes aux aminopénicillines et particulièrement *Pseudomonas aeruginosa* et les *Enterococcus* (Bush and Jonhson, 2000).

1.2.2 Les céphalosporines

La recherche d'antibiotique a mené à la découverte d'une nouvelle sous-classe de β -lactamines. Cette fois, par le scientifique Brotzu en 1945 et caractérisé/isolé par Newton/Abraham en 1956 (Mohr, 2016). Le besoin urgent de trouver une solution aux staphylocoques résistants aux pénicillines a grandement accéléré la découverte de cette nouvelle classe. La première représentante est la céphalosporine C isolée d'une souche de *Cephalosporium* qui a ensuite été optimisée pour augmenter son activité antibiotique (Demain and Zhang, 1998). Comparativement aux pénicillines, le squelette de la molécule est aussi composé du cycle β -lactame, mais celui-ci est rattaché au cycle dihydrothiazine comprenant six atomes au lieu de

cinq (voir figure 2) (Demain and Elander, 1999). Les céphalosporines sont résistantes aux pénicillinases et sont classées en génération selon leur spectre d'activité. La première génération, avec par exemple le céfazolin, inhibe les Gram+ seulement. La deuxième génération visait à élargir le spectre aux bactéries à Gram-. Puis les troisièmes et 4e générations à couvrir un plus large spectre d'activité contre certaines bactéries naturellement résistantes aux céphalosporines de 2^e génération (Harrison and Bratcher, 2008). La 5^e génération de céphalosporine regroupe les molécules capables d'inactiver les staphylocoques résistants à la méthicilline (SARMs) (e.g. ceftaroline et ceftobiprole) (Moisan et al., 2010 ; Giacobbe et al., 2019).

1.2.3 Les monobactames

Les monobactames ont un spectre d'activité contre les bactéries à Gram-, mais très peu contre les Gram+. La seule molécule utilisée en clinique est l'aztréoname. Cette dernière sous-classe est caractérisée par un cycle β -lactame unique ainsi qu'un acide sulfonique attaché en N1 (voir figure 2) (Sykes et al., 1982).

1.2.4 Les carbapénèmes

La découverte des carbapénèmes se synchronise avec la recherche d'inhibiteurs de β -lactamase, alors que la résistance aux β -lactamines augmente avec leur utilisation. La première carbapénème découverte était la thiénamycine de laquelle descendent toutes les autres carbapénèmes naturelles ou semi-synthétiques (imipénème, méropénème, doripénème, tébipénème, etc.) (Zhanel et al., 2007). La thiénamycine, bien qu'active était instable en milieu aqueux. Pour pallier la situation, l'imipénème a été développé. Malheureusement, celle-ci s'est trouvée dégradée par la déhydropeptidase rénale (DHP-I). Ainsi, l'imipénème doit être administré avec la cilastine, un inhibiteur de la DHP-I (Edwards et al., 2005). Les autres carbapénèmes qui ont découlé de l'imipénème arborent en C1 un groupement 1 β -méthyle qui

stabilise les carbapénèmes face à l'enzyme. Cette sous-classe de β -lactamines se définit par une pénicilline avec un double lien entre C2 et C3 ainsi qu'un carbone à la place du soufre en C1.

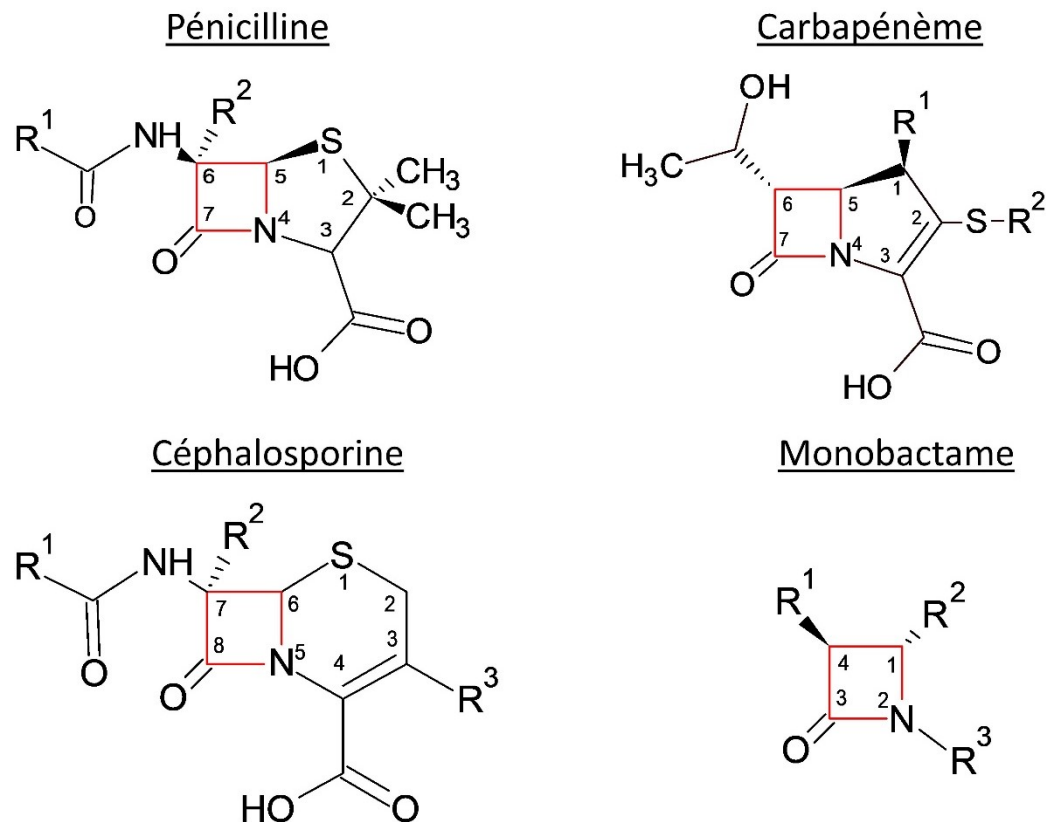


Figure 2. Représentation des différentes classes de β -lactamines. En rouge est représenté le cycle β -lactame. Les atomes numérotés pour la pénicilline représentent le squelette 6-APA, dont le cycle thiazolidine à cinq atomes. Les céphalosporines quant à elle ont un cycle dihydrothiazine à six atomes. Les carbapénèmes, en C1, ont un carbone à la place du soufre qui est rattaché en C2. Un double lien unit C2 et C3 contrairement aux pénicillines. La chaîne latérale R1 stabilise contre DHP-I, alors que le groupe trans- α -1-hydroxyéthyl en C6 réduit la sensibilité aux β -lactamases. Les monobactames n'ont que le cycle β -lactame à 4 atomes. Les chaînes latérales R1, R2 et R3 vont varier selon la molécule et donneront la spécificité pour l'une ou l'autre des cibles (les PBPs). Les schémas des molécules sont inspirés de Bush and Bradford (2016).

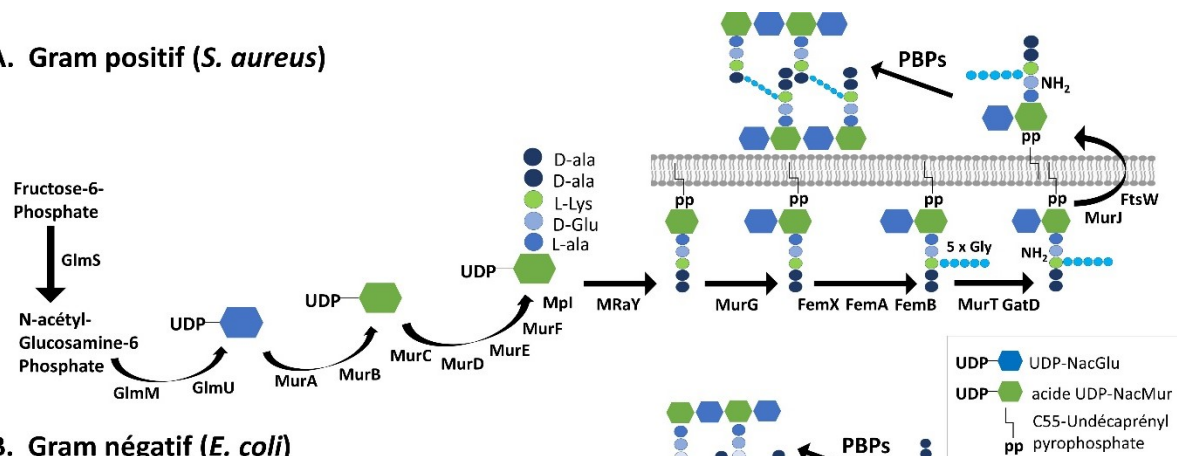
Le soufre sera retrouvé en C2 pour relier la chaîne latérale (Moellering et al., 1989). De plus, la chaîne en C6 n'est plus attachée au cycle β -lactame par une amine, mais par un lien trans- α -1-hydroxyéthyl. Ce lien procure l'avantage de rendre les carbapénèmes résistantes face aux β -lactamases dû à ce même groupement en C6 qui cause de l'encombrement stérique (Papp-Wallace et al., 2011). C'est la chaîne R2 qui varie entre les différentes molécules (voir figure 2) et donne la spécificité.

1.3 L'activité inhibitrice des β -lactamines

1.3.1 L'assemblage du peptidoglycane

Le mode d'action des β -lactamines repose sur l'inhibition de la formation du peptidoglycane (PG). Cette structure essentielle est retrouvée chez la grande majorité des bactéries pour le maintien de leur intégrité et leur résistance aux chocs osmotiques. La formation du PG (décrit en figure 3) varie légèrement selon le microorganisme (Schleifer and Kandler, 1972). Généralement, il s'agit de chaînes glycanes composées d'une alternance de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique attachés en $\beta,1\rightarrow4$, ainsi que des liens covalents unissant les pentapeptides (Ghuysen, 1968). Le PG est un assemblage de sous-unités appelées lipides II. Le lipide II varie entre les bactéries à Gram⁺ et Gram⁻, puis entre les différentes espèces. Les sucres sont constants, mais les résidus composant le pentapeptide diffèrent selon les ligases (Mur) que possède la bactérie (Schleifer and Kandler, 1972). Par contre, le 4^e résidu pour toutes les espèces est une D-alanine (Vollmer et al., 2008). L'obtention du lipide II passe par plusieurs réactions enzymatiques et l'assemblage est assuré par les enzymes cibles des β -lactamines; les PBPs (Barreteau et al., 2008; Blumberg and Strominger, 1974).

A. Gram positif (*S. aureus*)



B. Gram négatif (*E. coli*)

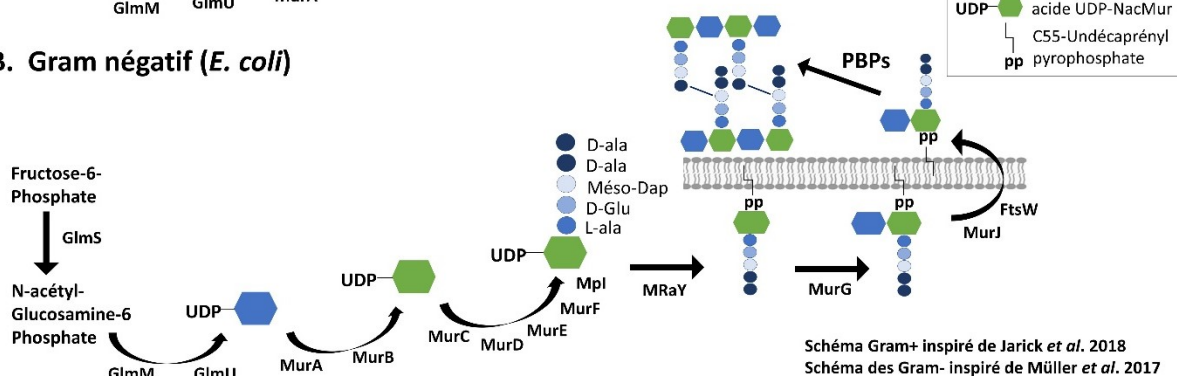


Figure 3. Schéma de la formation du peptidoglycane des bactéries à Gram+ (*S. aureus*) et Gram- (*E. coli*). D'abord, le F6P est modifié par GlmS pour l'obtention du NacGlu-6P. Celui-ci est isomérisé (GlmM) et une uridylyltransférase (GlmU) produit l'UDP-NacGlu. Les enzymes MurA et MurB, ayant respectivement une activité transférase et une réductase, modifient l'UDP-NacGlu en acide UDP-NacMur. Puis, les enzymes MurC à MurF forment le pentapeptide et une ligase (Mpl) termine la liaison au UDP-NacMur. Par la suite, l'UDP-NacMur-pentapeptide est rattaché à la membrane par la translocase (MRaY) qui transfère la molécule sur C55-UNDP engendrant le lipide I. Pour les bactéries à Gram- (**B**) le lipide I est modifié en lipide II par une glycosyltransférase (MurG) qui lie au UNDP-NacMur-pentapeptide un NacGlu. Pour les bactéries à Gram+ (**A**) le lipide II est modifié. Sur la L-lysine des peptidyl-transférases non-ribosomales (FemX, A et B), ajoutent 5 glycines et l'acide D-glutamique est désaminé. Ensuite, autant pour les bactéries à Gram- que Gram+, le lipide II est renversé par des flippases dans l'espace périplasmique (Gram-) ou la face externe de la membrane (Gram+). Finalement, Les PBPs sont des transpeptidases/transglycosylases/endopeptidases/carboxypeptidase qui assemblent et entretiennent la structure du peptidoglycane. Les schémas sont inspirés de Jarick et al., (2018) et de Müller et al., (2017).

1.3.2 Les *penicillin-binding proteins*

Les *penicillin-binding proteins* (PBPs) portent ce nom, car elles sont les cibles des β -lactamines peu importe la sous-classe (pénicilline, céphalosporine, carbapénème, etc.). Les PBPs sont un groupe d'enzymes qui catalysent les réactions de transpeptidation entre les chaînes peptidiques des lipides II, les réactions de transglycosylation pour former la chaîne glycane en plus d'assurer le remodelage du PG (Blumberg and Strominger, 1974). Traditionnellement, les PBPs sont classées selon leur poids moléculaire et séparées selon celles ayant un haut poids moléculaire et celles ayant un bas poids moléculaire, peu importe leur fonction. Cette nomenclature a été raffinée avec les classes A, B et C, selon la fonction de la partie N-terminale et l'organisation en acides aminés des enzymes (Ghuysen, 1991; Goffin and Ghuysen, 1998). Les classes A (PBP1 généralement) sont les PBPs qui possèdent la fonction transglycosylase. Celles de la classe B (PBP2 et PBP3 généralement) possèdent uniquement l'activité transpeptidase. Puis celles de classes C (PBP4, PBP5, PBP6, etc.) sont des carboxypeptidases ou endopeptidases. Ce type de classement assure une meilleure comparaison interespèce (Sauvage and Terrak, 2016). Par exemple, la PBP4 occupe des fonctions bien différentes selon l'espèce. Chez *E. coli* c'est une endopeptidase, chez *S. aureus* c'est une transpeptidase/carboxypeptidase, alors qu'elle sera une transglycosylase/transpeptidase chez *Listeria monocytogenes* (Navratna et al., 2010; Jeong et al., 2013). Dans cet exemple, les PBP4 seraient plutôt nommées C4, C5 et A4 respectivement (Sauvage et al., 2008). Préciser la classe fonctionnelle permet d'établir une meilleure comparaison et anticiper l'effet bactéricide d'une β -lactamine. Génétiquement, les PBPs d'une même classe (A, B et C) descendent d'un ancêtre commun et auraient divergé et acquis/perdus des fonctions (Goffin and Ghuysen, 1998). Une PBP homologue entre deux espèces aura habituellement les mêmes fonctions et donc la même classe (ex: PBP3: B3 d'*E. coli* et PBP3: B3 de *Pseudomonas aeruginosa*), alors que des paralogues seront, au sein d'une même espèce, des PBPs de même classe, mais occupant une fonction différente. Par exemple, chez *E. coli* la PBP2 et la PBP3 sont de classe B, mais l'une est B2 et l'autre B3 puisqu'elles n'occupent pas la même fonction biologique. La PBP2 est une transpeptidase impliquée dans d'élargissement

et l'organisation du PG, alors que la PBP3 est une transpeptidase impliquée dans la septation (Spratt, 1975; Goffin and Ghuysen, 1998).

1.3.3 L'activité enzymatique des PBPs

Les PBPs peuvent effectuer quatre types de réactions enzymatiques : la transpeptidation, la transglycosylation, la carboxypeptidation et l'endopeptidation (Spratt and Cromie, 1988). D'abord, la transpeptidation, la carboxypeptidation et l'endopeptidation sont effectuées par l'entremise d'une sérine au site actif des PBPs. Le motif au site actif peut varier. Pour les

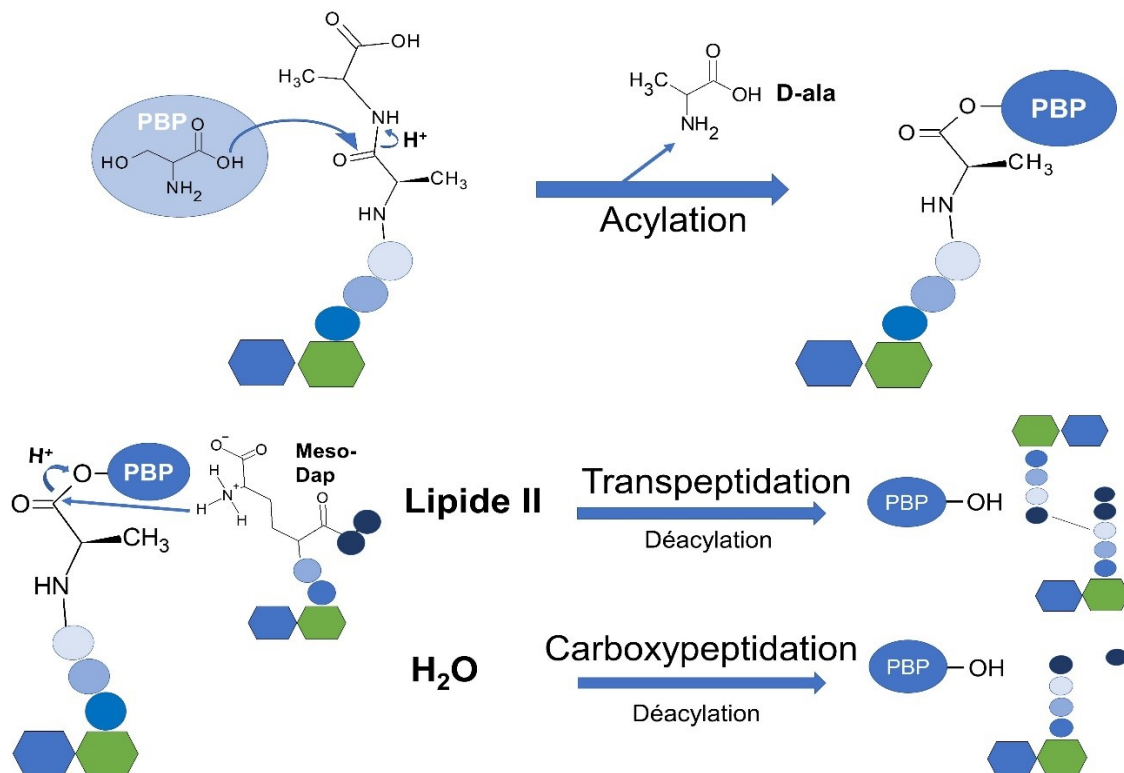


Figure 4. Schéma des réactions de transpeptidation et carboxypeptidation effectuées par les PBPs. L'acylation se fait de la même façon, mais la déacylation changera selon la PBP et le substrat utilisé. Pour l'exemple, le méso-dap est représenté comme substrat aminé d'un second lipide II pour former les liens entre les peptides. Pour la carboxypeptidation, l'acylation libère la partie C-terminale de l'avant dernier D-ala et la molécule d'eau est nécessaire pour que la PBP se détache du complexe. Le schéma est inspiré de Lee et al., (2001).

transpeptidases, les motifs les plus retrouvés sont: Ser-XX-Lys, Ser-X-Asn, Lys-Thr/Ser-Gly-Thr (Ghuysen, 1991). Le mécanisme de transpeptidation est semblable à celui de la carboxypeptidation (Nicholas et al., 2003, Umbreit and Strominger, 1973). Dans les deux cas, le D-alanyl-D-alanine final du pentapeptide subissent une attaque nucléophile par la sérine du site actif des PBPs transpeptidases ou carboxypeptidases. Il y a alors formation du complexe acyl-enzyme. Alors, la partie C-terminale de la quatrième D-alanine est libérée et la 5^e D-alanine relâchée (voir figure 4) (Tipper and Strominger, 1965 and Lee et al., 2001). Pour la déacylation du complexe, la réaction requière un récepteur d'un second groupe amine sur un peptide substrat engendrant la formation d'un lien covalent entre les deux (e.g. chez *E. coli* ce sera un lien entre le 4^e D-ala et le méso-dap) (Schwartz et al., 2001; Ghuysen, 1991). Les carboxypeptidases, de petits poids moléculaires, s'avèrent non essentielles une fois déplétés (Matsushashi et al., 1977).

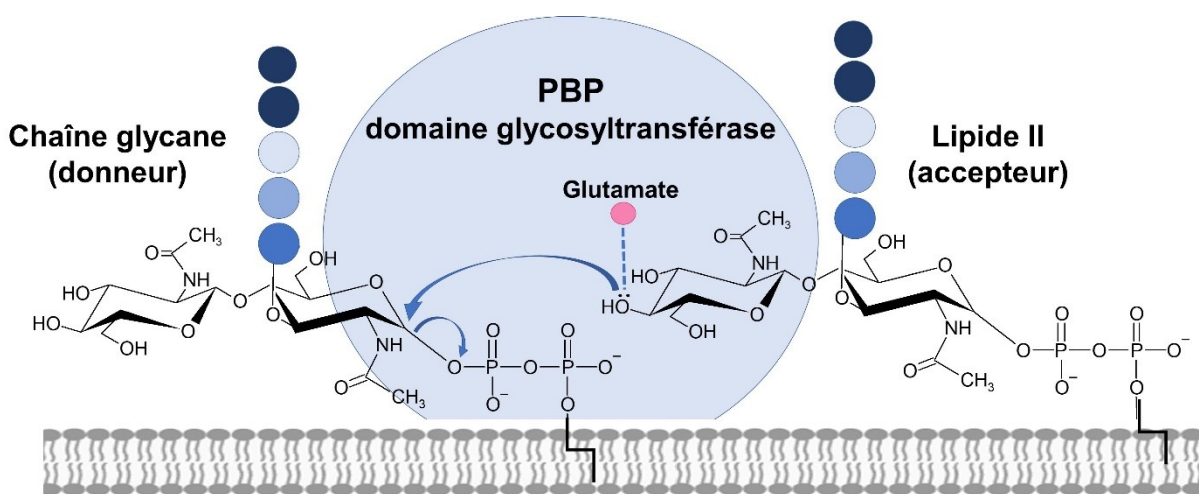


Figure 5. Schéma d'une réaction de transglycosylation effectuée par une PBP. Ici est représentée la PBP1b d'*E. coli*. Le glutamate (Glu233) catalyse la déprotonation du 4-OH du UDP-NacGlu. Engendrant l'attaque nucléophile sur le C1 de l'acide UDP-NacMur pour engendrer le lien glycosidique $\beta 1, \rightarrow 4$ et libérer le C55-UNDP. Le schéma est inspiré de Terrak et al., (2008) et de Barrett et al., (2005).

La transglycosylation est effectuée par des PBPs portant un domaine transglycosylase majoritairement en N-terminal et rattaché à la membrane. La réaction débute par la déprotonation du OH en C4 du UDP-NacGlu par le glutamate (Terrak et al., 1999; Terrak et al.,

2008). Il y aura alors attaque nucléophile sur le C1 de l'acide UDP-NacMur lié au C55-UND pour former un nouveau lien glycosidique $\beta,1 \rightarrow 4$ entre le lipide II et la chaîne glycanique (voir figure 5) (Schwartz et al., 2001). L'endopeptidation est une réaction qui coupe les liens entre les liens peptidiques (D-ala \rightarrow méso-dap par exemple). C'est une réaction importante pour le recyclage et le remodelage du peptidoglycane. Des mutants d'*E.coli* n'exprimant plus la PBP4 endopeptidase restent viables *in vitro* montrant qu'elles ne sont pas essentielles à la croissance (Iwaya and Strominger, 1977). Cependant, dans un modèle *in vivo* et de résistance à certains stress, comprenant les antibiotiques, la PBP4 aiderait au maintien de l'intégrité et de la forme bactérienne (Korat et al., 1991; Lai et al., 2017).

1.3.4 L'inhibition des PBPs par les β -lactamines

La synthèse du PG est une structure essentielle ciblée par plusieurs molécules antibiotiques. Les β -lactamines agissent en inhibant les fonctions transpeptidase carboxypeptidase et endopeptidase des PBPs qui seront inhibées. En fait, les enzymes liées par les β -lactamines sont résumées sous l'acronyme *active-site serine penicillin recognizing enzymes* (ASPRES). Ce qui inclut aussi les β -lactamases de classes A, C et D (Oliva et al., 2003 ; Zapun et al., 2008).

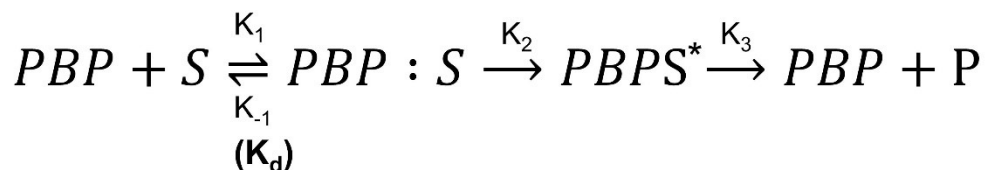


Figure 6. Formule de la réaction enzymatique générale des PBPs. Ici, l'acylation des PBPs (PBP) avec leur substrat (S) est représentée. Le k_{-1}/k_1 correspond à la constante de dissociation K_d entre la PBP et le substrat. PBP:S correspond au complexe de Michaelis réversible et PBPS* le complexe PBP acylé stable. P est le produit résultant de la déacylation. Les constantes k_2 et k_3 (s^{-1}) correspondent à la vitesse d'acylation et de déacylation. La réaction est modifiée de Ghuysen et al., (1986).

Une PBP bifonctionnelle, qui possède deux sites catalytiques dont un site de transglycosylation (comme la PBP1a et 1b d'*E. coli*) pourra toujours effectuer la liaison des unités glycanes, mais

n'effectuera plus de transpeptidation (Nakagawa et al., 1984; Spratt and Cromie, 1988). Cet effet peut aussi être observé chez *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM). Ici, la résistance aux β -lactamines est possible due à l'entremise de la fonction transglycosylase toujours fonctionnelle de la PBP2 et l'acquisition de la PBP2a une transpeptidase ayant peu d'affinité pour les β -lactamines due à sa structure et à l'encombrement stérique (Pinho et al., 2001). Le châssis moléculaire des β -lactamines est analogue au substrat D-ala-D-ala des PBPs (Tipper and Strominger, 1965). Cependant, une fois la β -lactamine liée à la sérine du site actif, la déacylation est très lente ou devient irréversible (Frère et al., 1976). Le site catalytique reste donc occupé et l'action de l'enzyme est inhibée (Spratt and Cromie, 1988). Afin d'illustrer, l'équation à la figure 6 présente la réaction enzymatique entre une PBP (ou une β -lactamase) et un substrat. Chacune des PBPs aura une constante de dissociation (K_d) différente pour chaque substrat, que ce soit le D-ala-D-ala, une pénicilline, une céphalosporine, etc. Les constantes k_2 et k_3 (s^{-1}) correspondent à la vitesse d'acylation et de déacylation (Oliva et al., 2003). Généralement, une β -lactamine efficace (pour une concentration donnée) aura un ratio d'acylation k_2/K_d ($M^{-1} \cdot s^{-1}$) grand signifiant une acylation rapide et une vitesse de déacylation (k_3) négligeable pour le temps de dédoublement bactérien ($\leq 10^{-4} s^{-1}$). De plus, la β -lactamine doit pouvoir se solubiliser minimalement dans la membrane lipidique autant pour sa diffusion que sa liaison (Ghuysen et al., 1986; Frère et al., 1992). Pour ce mémoire, les concentrations antibiotiques nécessaires pour acyler de manière stable 50% des PBPs totales sont mesurées (IC_{50}). Cette mesure est prise pour un temps de contact déterminé de 10 minutes, à différentes concentrations ascendantes de substrat et à une concentration saturante de BoFL (une pénicilline fluorescente). Alors, il sera possible de voir à quelle concentration du substrat la fluorescence est diminuée de 50% impliquant une liaison de 50 % des PBPs par la β -lactamine testée (Zhao, et al., 1999 ; Hujer et al., 2005). Pour une étude de cinétique, si k_3 est négligeable (1), que la concentration de substrat surpasse la somme du nombre de l'ensemble des PBPs (2), qu'il n'y a plus de β -lactamases résiduelles dans l'extrait (3) et que le temps de contact est constant (4), alors les mesures d' IC_{50} peuvent être utilisées pour déterminer expérimentalement le taux d'acylation pour chacune des PBPs (Ghuysen et al., 1986; Frère et al., 1992). Ici, les mesures d' IC_{50} seront plutôt utilisées

pour dresser un portrait global de l'inhibition de toutes les PBPs d'une espèce et voir laquelle est la plus sensible à la β -lactamine testée.

1.4 Les mécanismes de résistance et les défis cliniques

Les premiers signes de résistance aux β -lactamines se sont manifestés dans les années 40. Abraham et Chain ont décrit, chez *E. coli*, une enzyme capable d'inhiber la pénicilline. Or, à l'époque, les β -lactamines étaient utilisées pour le traitement d'infection à bactérie Gram⁺ principalement, la découverte a donc été jugée cliniquement non préoccupante. Deux ans plus tard, on décrit une enzyme semblable chez *S. aureus* (nommé PC1). Puis, il faudra deux ans de plus pour que Kirby isole l'enzyme jetant une ombre sur la découverte qui avait ébranlé la médecine de l'époque (Kirby, 1944). Bien que cette découverte ait forcé la recherche sur de nouvelles molécules à cette époque, la surutilisation des β -lactamines à grande échelle est ce qui a sélectionné les organismes possédant des β -lactamases multiples (O'Neil, 2014 ; Spellberg et al., 2008). Ces enzymes sont la principale stratégie de résistance face aux β -lactamines. Cependant, on en dénombre d'autres. D'abord, limiter l'entrée est une stratégie efficace. En fait, la membrane externe des bactéries à Gram⁻ est une défense intrinsèque (Nikaido, 1989). Pour agir, les molécules antibiotiques doivent posséder les caractéristiques physicochimiques leur permettant d'utiliser des canaux majoritairement non spécifiques (les porines) ou en diffusant directement au travers des membranes. Les porines sont multiples et variables dans leur sélectivité, cependant la majorité sont seulement sélectives pour la taille, la charge des molécules et l'hydrophobicité des molécules (Zimmermann and Rosselet, 1977; Nikaido et al., 1983). Les β -lactamines empruntent ces porines pour pénétrer la membrane externe, mais peuvent se trouver neutraliser par la perte de celles-ci. Par exemple, la perte d'OrpD chez *P. aeruginosa* engendre un phénotype à sensibilité réduite aux carbapénèmes dont l'imipénème et l'ertapénème (Fournier et al., 2013 ; Quale et al., 2006). Le prochain mécanisme est la perte d'affinité du site actif des PBPs pour les β -lactamines par mutations ou recombinaison ou encore par le gain de nouvelles PBPs (Bush, 2018). Parmi les exemples les plus marquants on compte l'acquisition du gène *mecA* de *S. aureus* qui code pour la PBP2a dont l'affinité est réduite et qui

pallie l'inhibition des autres transpeptidases. Il y a aussi la PBP2x chez *S. pneumoniae* (Fisher and Mobashery, 2016). La troisième est dans une moindre mesure les pompes à efflux qui représentent un niveau intermédiaire de résistance (Kojima and Nikaido, 2013; Li et al., 2015; Li et al., 1995). Bien qu'elles pompent du cytoplasme vers l'extérieur, Li et al., (1994) ont présenté un modèle où certaines pompes (comme le complexe MexAB-OprM chez *P. aeruginosa*) permettaient de sortir certaines β -lactamines, comme la carbénicilline, du périplasme (Li et al., 1994 ; Lister et al., 2009). Les niveaux de résistances ont été observés chez certaines souches qui surexprimaient certaines pompes et dont les gènes codants pour des β -lactamases avaient été déplétés (Masuda et al., 1999). Seulement, une résistance totale requiert la combinaison de différents mécanismes (Li et al., 2015).

1.4.1 Le mode d'action des β -lactamases

Les β -lactamases sont des enzymes pouvant être retrouvées chez les bactéries à Gram⁺, mais sont plus souvent associées à la résistance chez les bactéries à Gram⁻ (Bush, 2018). Ces enzymes sont nombreuses et sont classées selon la méthode Ambler (voir figure 7) qui combine la séquence en acides aminés, la fonction et le spectre d'activité (Ambler, 1980 ; Bush et al., 1995). De nos jours, nous comptons près de 2770 β -lactamases isolées de différentes souches/espèces bactériennes et fongiques (Bush, 2018). L'explication de leur origine n'est pas unanime et balance entre des enzymes dont le rôle serait exclusivement la protection de l'organisme face aux β -lactamines retrouvées dans la nature ou bien des dérivés d'anciennes PBPs qui auraient évolué pour protéger l'organisme des β -lactamines (Richmond and Skyes, 1973; Massova and Mobashery, 1998). En effet, leur mode d'inhibition se rapproche des PBPs de bas poids moléculaire qui effectuent la carboxypeptidation ou l'endopeptidation (Ambler, 1980; Massova and Mobashery, 1998). Cependant, les β -lactamases n'interfèrent pas dans la construction du PG (Ghuysen, 1991). Cette théorie s'appliquerait bien aux β -lactamases de classe A, C et D qui possèdent une sérine en leur site actif tout comme les PBPs. Pour la classe B, dont le site actif est composé d'un ou de deux ions zincs, l'origine est plus controversée. L'idée d'une PBP comme ancêtre commun est aussi discutée (Massova and Mobashery, 1998) et on ajoute la

possibilité d'une divergence de fonctions à partir d'une enzyme possédant un zinc à son site actif. En effet, une variété d'enzyme possédant cet atome au site actif existe (PBP de *Streptomyces albus*, des flavoprotéines, des glyoxalases, etc.) (Alderson et al., 2014). Quoiqu'il

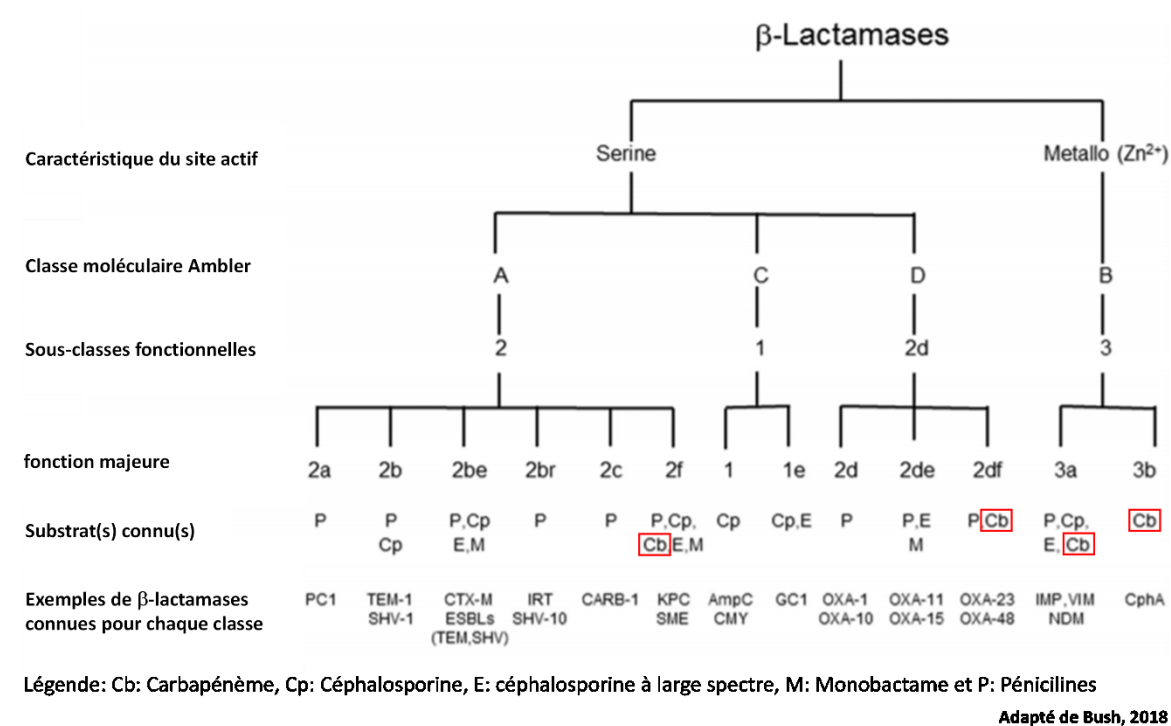


Figure 7. Schéma adapté de la classification des β-lactamases. Ces enzymes sont séparées selon la singularité de leur site actif, puis classées selon leur séquence en acide aminé et leur fonction. Pour chaque sous-classe, la/les β-lactamines cibles sont identifiées. Encadrées en rouge, sont les sous-classes capables d'inhiber les carbapénèmes (par exemple: KPC-2/3, OXA-48 et les métallo-β-lactamases). Le schéma est modifié de Bush (2018).

en soit, c'est l'utilisation des β-lactamines qui a engendré une pression de sélection et favorisée leur émergence, leur dispersion sur des éléments génétiques mobiles et leur persistance (Bush, 2018 ; Lopatkin et al., 2017). Enfin, il a été nécessaire de les classer. D'abord, les groupes A, C et D possèdent une sérine en leur site actif (Bush, 2013). La sérine acyle le cycle β-lactame et une molécule d'eau a, cette fois, accès au site catalytique pour effectuer l'attaque nucléophile (voir figure 8) et l'hydrolyse (Ghuysen, 1991 et Drawz and Bonomo, 2010). La cinétique des β-lactamases des classes A, C et D obéit à la formule présentée à la figure 6. Seulement, la vitesse

de déacylation (k_3) sera rapide (parfois atteint le taux de diffusion de l'antibiotique dans la cellule) (Zimmermann and Rosselet, 1977; Frere et al., 1992). La β -lactamase est donc libérée laissant l'antibiotique ouvert et inactif. La classe A est diversifiée et compte les prévalentes

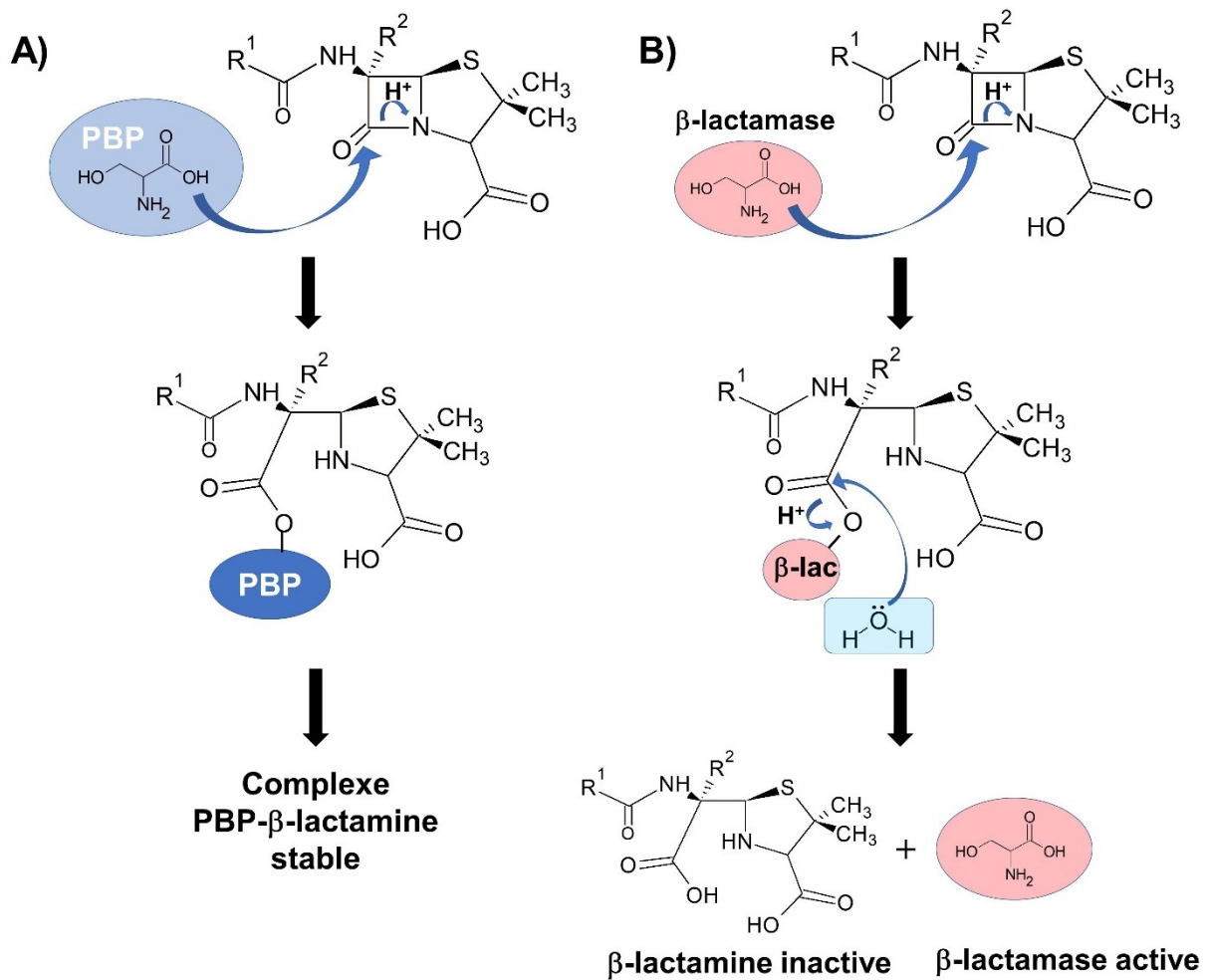


Figure 8. Comparaison schématique simplifiée des réactions enzymatiques impliquant les β -lactamines. L'attaque nucléophile est effectuée par la sérine du site actif des PBPs (A) ou de certaines β -lactamases (B) de classe A, C ou D sur la β -lactamine (ici une pénicilline). Ensuite, la déacylation est soit bloquée par encombrement stérique engendrant l'inhibition de la PBP, soit possible à l'aide d'une molécule d'eau laissant le cycle β -lactame ouvert et l'antibiotique inhibé. Le schéma est inspiré de Lee et al., (2001) et de Papp-Wallace et al., (2011).

TEM-1 et SHV-1 et tous les dérivés apparus à la suite de mutations ponctuelles. Ces mutations affectent l'ouverture du site actif et ceci fait varier leur affinité pour les classes de β -lactamines (Bush, 2013). Avec CTM-X, ces trois enzymes sont les principales ancêtres des connues ESBLs (*extended spectrum β -lactamase*) capables de lyser toutes les classes de β -lactamines mis-à-part les carbapénèmes (Bush, 2013 ; Philippon et al., 1989). La classe C, décrite pour la première fois par Jaurin et Grundstrom (1981), est composée majoritairement des céphalosporinases chromosomales, bien que leur prévalence sur des plasmides augmente. Une des enzymes représentantes est AmpC retrouvé chez *E. coli* et *P. aeruginosa* entre autres (Jaurin and Grundstrom, 1981). Leur site actif est aussi constitué d'une sérine, dont la position et le motif diffèrent de la classe A (Joris et al., 1988). Ces enzymes ont aussi la caractéristique d'être inductibles puisqu'elles sont de grosses protéines d'environ 360 aa, alors que les classes A et D dépassent rarement 310 aa (Bush, 2013). La classe D était auparavant reconnue comme des oxacillinases. Les premières enzymes de cette classe isolée étaient OXA-2 et PSE-2 (maintenant nommé OXA-10) (Dale et al., 1985; Huovinen et al., 1988). Une sérine est aussi retrouvée au site actif, mais le motif du site actif diffère des classes A et C. Les enzymes de cette classe sont très prévalente chez *A. baumannii* et sont souvent associées à cette espèce (Poirel et al., 2010). Il existe aussi des métallo- β -lactamases (M β LS) dont l'ion central est le Zn^{2+} (Orellano et al., 1998). Ces enzymes constituent la classe B et hydrolysent toutes les classes de β -lactamines, mis à part les monobactames comme l'aztréoname (par contre celui-ci est hydrolysé par plusieurs S β LS) (Wang et al., 2014). Ici, le mécanisme d'inhibition ne nécessite pas un intermédiaire, mais est généré par une attaque directe d'un ion hydroxyde stabilisé par le Zn^{2+} et certains acides aminés comme l'histidine (Lisa et al., 2017). Brièvement, il y a trois sous-classes de métallo- β -lactamase B1, B2 et B3 qui se différencient dans leur séquence d'acide aminé. B1 et B3 sont actifs à l'aide d'un ou deux ions Zn^{2+} . B2 requiert un seul Zn^{2+} . En fait, la liaison d'un 2^e ion Zn^{2+} l'inhibe (Bush, 1998).

1.4.2 Les thérapies combinées avec inhibiteurs de β -lactamases

Pour pallier les problèmes cliniques des β -lactamases, les recherches se sont orientées vers la découverte de molécules capables de les inhiber. L'acide clavulanique a été le premier inhibiteur de β -lactamases isolé de *Streptomyces clavuligerus* (Reading and Cole, 1977). Il est reconnu pour être actif contre les β -lactamases de classe A principalement. Il fait partie des trois premiers inhibiteurs, avec le sulbactam et le tazobactam (deux pénicillines sulfones synthétiques), dont la combinaison avec une β -lactamine soit approuvée par la *Food and Drugs Administration* (FDA) comme traitement antibiotique (Bush and Bradford, 2016). Dans le tableau 1, sont énumérés certains anciens et nouveaux inhibiteurs selon les classes fonctionnelles des β -lactamases pour lesquelles ils ont une action inhibitrice. La difficulté pour le développement des I β LS est l'obtention d'une molécule à large spectre capable d'inhiber plus d'une classe. Ceci est encore plus important pour les M β LS, pour qui la découverte d'un inhibiteur des classes B1, B2 et B3 est un réel défi (Krajnc et al., 2019). L'acide clavulanique, le tazobactam et le sulbactam étaient utilisés pour leur affinité aux ESBLs, mais restent inefficaces face à la montée des classes B, C et D et de KPC-2 (Bush and Bradford, 2019; Papp-Wallace et al., 2010). Leur affinité est plus élevée pour les β -lactamases cibles que pour les PBPs. Ils subissent donc l'attaque nucléophile à la place des antibiotiques actifs (comme présenté à la figure 8) auxquels ils sont combinés. Ensuite, le lien covalent peut être hydrolysé et engendrer la dégradation de l'inhibiteur (Drawz and Bonomo, 2010). La découverte des diazabicyclooctanes (DBOs), des inhibiteurs n'étant pas eux-mêmes des β -lactames, comme l'avibactam, démontre une activité à large spectre en inhibant les classes A, C et D, en plus de KPC-2 et OXA-48 reconnus pour leur capacité à hydrolyser les carbapénèmes (Emeraud et al., 2019). De plus, sa combinaison avec l'aztréoname permet d'élargir le spectre d'action à certaines M β LS (NDM, VIM et IMP particulièrement) (Wang et al., 2014). Autres différences notables, les DBOs ne sont pas des inhibiteurs « suicide », puisqu'aucun lien covalent n'est établi entre eux et la cible (Asli et al., 2016; King et al., 2016). L'idée est que leur liaison soit plus longue que le temps de division entre deux générations bactériennes (plus de 20 minutes) (Ehmann et al., 2012). L'avantage est qu'ils ne sont pas dégradés ou neutralisés et peuvent agir sur plusieurs cibles.

Tableau 1. Récapitulatif des inhibiteurs des SβLs et MβLs

Spectre d'inhibition des IβLs selon leur sous-classe fonctionnelle et leur classe Amber/Bush-Jacoby ^a																
		A							C		D			B		REF
Classes	IβLs ^b	2a	2b	2be	2br	2c	2e	2f	1	1e	2d	2de	2df	3a ^c	3f	Modifié de Bush, 2018
Clavam	CLAV	+	+	+	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	Bush and Bradford, 2016 Drawz and Bonomo, 2010
Acides pénicilliques sulfones	SUL	+	+	+	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	Bush and Bradford, 2016 Drawz and Bonomo, 2010
	TAZ	+	+	+	–	+	+	±	±	±	–	–	–	–	–	Bush and Bradford, 2016 Drawz and Bonomo, 2010 Berrazeg et al., 2015
	ENM	+	+	+	–	ND	ND	+	±	±	–	–	–	–	–	Bush and Bradford, 2019 Papp-Wallace, 2019
DBOs	AVI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±	–	Papp-Wallace, 2019 Emeraud et al., 2019 Ehmann et al., 2013
	REL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	±	–	–	Bush and Bradford, 2019 Livermore et al., 2013 Zhanel et al., 2017
	ZID	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	+	–	–	Bush and Bradford, 2019 Livermore et al., 2017
	DUR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–
Acides boroniques	VAB	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	–	–	–	–	–	Zhanel et al., 2017 Lapuebla et al., 2015
	TAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	Bush and Bradford, 2019 Krajnc et al., 2019
Acides 2-pyr. carboxylique	ANT431	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	±	–	Bush and Bradford, 2019 Everett et al., 2018

^a. +: inhibition; ±: inhibition faible ou seulement certaines enzymes de la sous-classe ; – : pas d'inhibition ; ND : non-déterminé.

^b. DBO: Diazabicyclooctanes, CLAV: Acide clavulanique, SUL: Sulbactam, TAZ: Tazobactam, ENM: Enmetazobactam, AVI: Avibactam, REL: Relebactam, ZID: Zidebactam, DUR: Durlobactam, VAB: Vaborbactam, TAN: Taniborbactam

^c. 3a inclut les classes B1 et B3.

Les inhibiteurs de type acide boronique jouent un rôle de compétition puisqu'ils sont analogues aux intermédiaires (l'intermédiaire tétraédrale principalement) de la réaction de dégradation de l'ensemble des β-lactamases (Krajnc et al., 2019). Contre les MβLs, plusieurs chélateurs ont été développés pour neutraliser les ions Zn²⁺. L'EDTA est un exemple, mais sa non-spécificité et son risque clinique empêche son utilisation (Franz, 2013). La recherche de solutions à la

prévalence grandissante des ESBLs a aussi mené à la découverte des carbapénèmes. Cette classe de β -lactamine est considérée comme étant des « substrats lents » (Papp-Wallace et al., 2011 ; Hazra et al., 2014). En fait, le lien en C6 (voir figure 2) peut engendrer de l'encombrement stérique, mais peut aussi interagir avec la molécule d'eau utilisée pour l'hydrolyse. Ce lien, peut se réarranger à la suite de la liaison de certaines β -lactamases et former un tautomère dont la vitesse de déacylation sera grandement diminuée (Papp-Wallace et al., 2011 ; Monks and Waley, 1988). Bien que l'utilisation des carbapénèmes ait sélectionné les carbapénèmases, leur prévalence est encore basse au Canada (Agence de la santé publique du Canada. Système Canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens-Rapport de 2018).

1.5 Le futur développement des β -lactamines

Les β -lactamines représentent la classe d'antibiotique la plus utilisée au monde et malgré la recrudescence des β -lactamases les solutions ne sont pas à l'abandon, mais plutôt à la revalorisation des molécules devenues inactives. Le développement intensif de thérapies combinées avec les I β Ls en est un exemple, la recherche de nouvelles carbapénèmes et de nouvelles portes d'entrée pour surpasser la sélectivité des membranes en sont d'autres.

1.5.1 La venue d'une nouvelle carbapénème orale

Un inconvénient à l'utilisation des carbapénèmes est leur voie d'administration. En fait, leur mode d'injection est majoritairement de manière parentérale (par intraveineuse particulièrement) (Zhanel et al., 2007). Les traitements avec cette classe de β -lactamines à large spectre sont donc très coûteux, mobilisent du personnel soignant et obligent les patients à demeurer à l'hôpital (Eckburg et al., 2019). Heureusement, une amélioration des traitements est à venir en Amérique du nord avec l'approbation d'une première carbapénème pouvant être administrée oralement. Cette carbapénème, le tébipénème pivoxil (commercialisé sous le nom Orapenem® depuis 2009), a été développée uniquement au Japon pour traiter plusieurs types d'infections ; oculaires, sinusites, otites, etc. (Hotomi et al., 2007; Yao et al., 2016). Or, les

normes nord-américaines requièrent des tests supplémentaires pour son approbation (Jain et al., 2018). En ce sens, la compagnie Spero Therapeutics Inc. travaille à l'approbation de cette carbapénème pour usage clinique en Amérique du Nord. L'application serait principalement contre les infections urinaires compliquées. D'autres carbapénèmes d'efficacité équivalente ou supérieure (méropénème, ertapénème, etc.) sont déjà utilisées pour traiter d'autres types d'infections (Jain et al., 2018; Arends et al., 2019). Or, l'accumulation de ces autres carbapénèmes dans l'urine est limitée, et ce surtout au niveau du tract urinaire supérieur pour le traitement des néphrites (Jain et al., 2018). En fait, le traitement habituel est l'administration de fluoroquinolone comme la ciprofloxacine. Cependant, la prévalence d'infections urinaires résistantes à ce traitement (dites infections urinaires compliquées) augmente (Talan et al., 2016). Pour pallier ce manque, Spero Therapeutics Inc. développe présentement une nouvelle formulation sous forme de tébipénème-pivoxil-Hydrobromate (SPR994) pour combattre les infections causées par des bactéries exprimant des ESBLs et résistantes aux fluoroquinolones. La raison pour laquelle cette carbapénème est priorisée des autres est son absorption. Le groupement pivaloyloxyméthyl estérifié au carbone en C2 facilite son absorption orale (présenté en gris à la figure 9). En fait, ce groupement favorise sa diffusion de l'intestin vers le plasma. C'est d'ailleurs lors de ce processus qu'une carboxyestérase pourra couper le groupement ajouté en C2 et libérer la forme active qui peut être récupérée dans l'urine (Kato et al., 2010; Tang et al., 2018). Or, il a été prouvé que le processus de transport actif par des transporteurs intestinaux était important. Il avait déjà été montré que certaines β -lactamines étaient transportées par le *peptide transporter 1* (PEPT1) (Snyder et al., 1997; Tamai et al., 1997) et que les *organic anion transporting polypeptides* (OATPs) pouvaient aussi être impliqué dans le transport de différentes drogues (Kobayashi et al., 2003). Dans un modèle cellulaire de cellules intestinales Caco-2, la preuve de l'implication d'un OATP a pu être établie, mais l'implication de PEPT1 serait négligeable (Kato et al., 2010). Plus d'études seraient nécessaires pour confirmer la réaction d'absorption. À la suite des études pharmacologiques, l'accumulation de la forme active dans les reins serait supérieure à 50%. En fait, la portion active (SPR859) excrétée dans l'urine varie entre 20 et 66% après 24 h. Cette variabilité était due à la formulation orale utilisée (relâchement lent ou immédiat), la quantité et l'intervalle des doses administrées et l'état des sujets de l'étude (s'ils jeûnaient ou avaient une diète grasse). Ces données confirment celles

Tébipénème-pivoxil (SPR994)

Tébipénème (SPR859)

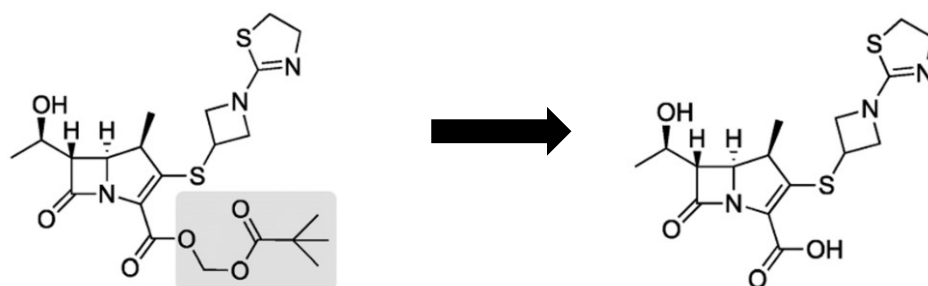


Figure 9. Schéma moléculaire de la prodrogue tébipénème-pivoxil et de la forme active tébipénème. La partie de la molécule en gris est le groupement estérifié conférant la stabilité face à l'acidité de l'estomac. Elle sera coupée par une carboxypeptidase retrouvée dans l'épiderme intestinal pour libérer la forme active (tébipénème) dans le plasma à la suite de l'absorption. Le schéma a été modifié de Rubio et al., (2018).

obtenues pour l'Orapénem® dont l'excrétion de la forme active dans l'urine variait entre 54-73% chez des sujets sains (Eckburg et al., 2019; Hotomi et al., 2007 ; Kato et al., 2010). Ainsi, la formulation préférée, pour l'instant, est une dose de 600 mg/pilules tous les 8 h pour 14 jours (Eckburg et al., 2019). Enfin, l'élément manquant pour l'approbation et la caractérisation du tébipénème (SPR859) est la preuve de liaison aux PBPs et du mécanisme bactéricide qui n'avait jamais été établi, mis à part contre la bactérie à Gram+ *Streptococcus pneumoniae* (Hotomi et al., 2007). Ainsi, la première partie de ce mémoire vise à établir la preuve de liaison aux PBPs des différentes espèces cibles dont *E. coli* et *K. pneumoniae* fréquemment isolées lors d'infections urinaires compliquées. Étant une carbapénème, son mode d'action sera l'acylation de la sérine du site actif des PBPs. L'affinité de liaison est mesurée par l'essai avec la BoFL, une pénicilline fluorescente. Ce test standardisé permet de visualiser et quantifier la liaison à toutes les PBPs des différentes espèces. Ce test, couplé aux mesures de concentrations minimales inhibitrices (CMI), ainsi qu'à de la microscopie, permettra de démontrer le mode d'action antibactérien du tébipénème (SPR859).

1.5.2 Les conjugués sidérophore- β -lactamine

Une autre méthode envisagée pour améliorer le traitement avec les β -lactamines est la revalorisation de celles-ci par leur conjugaison à un sidérophore. Comme dit précédemment, les bactéries à Gram- possèdent une résistance intrinsèque à plusieurs antibiotiques due à l'imperméabilité de leur membrane externe qui limite le passage de plusieurs molécules (Nikaido, 1989). Un antibiotique efficace doit donc soit diffuser ou utiliser les porines (Nikaido and Vaara, 1985). Les sidérophores ont l'avantage d'être reconnus par leur(s) propre(s) transporteur(s) spécifique(s) (Ferguson et al., 2000). Dans le cas des conjugués, ceux-ci jouent le rôle d'un cheval de Troie qui camoufle l'antibiotique et le fait pénétrer dans la cellule par les transporteurs de sidérophore (Ji et al., 2012 ; Lin et al., 2019). L'idée est inspirée de molécules, les sydénomycines, synthétisées normalement par certains microorganismes pour la compétition dans les environnements aux ressources limitées (Braun et al., 2009). Ces molécules ont été d'abord découvertes pour leurs propriétés antibiotiques lors d'un criblage. C'est par la suite qu'on a observé leur partie sidérophore (Knusel and Nuesh, 1965). La première décrite est l'albomycine dont la partie sidérophore est un hydroxamate (le ferrichrome) et l'antibiotique agit en inhibant la seryl-ARNt- synthétase (Stefanska et al., 2000). Ce qui a été approuvé est que l'antibiotique seul sans le sidérophore était sans effet sur la majorité des espèces bactériennes testées. Ceci démontrait du potentiel de valorisation des sidérophores (Vořšek and Grünberger, 1966; Stefanska et al., 2000). Par la suite, plusieurs essais de synthèses de composés SID-ATB ont été effectués. Ceux qui connaissent présentement le plus gros succès sont ceux conjugués à une β -lactamine. Ces antibiotiques sont une classe de choix pour la conjugaison afin de combattre les infections de bactéries à Gram-, car leurs cibles, les PBPs, se retrouvent dans l'espace périplasmique et le transport actif vers le cytoplasme n'a pas à être utilisé (voir figure 10). La raison qui explique cette efficacité est principalement due à l'essentialité du fer pour les bactéries. Sous forme d'ions et dans un milieu oxygéné, la forme oxydée non soluble Fe^{3+} est prépondérante (Hider and Kong, 2010). En fait, une bactérie a besoin d'une concentration de 10^{-5} à 10^{-7} M pour une croissance optimale. Dans l'environnement, on retrouve

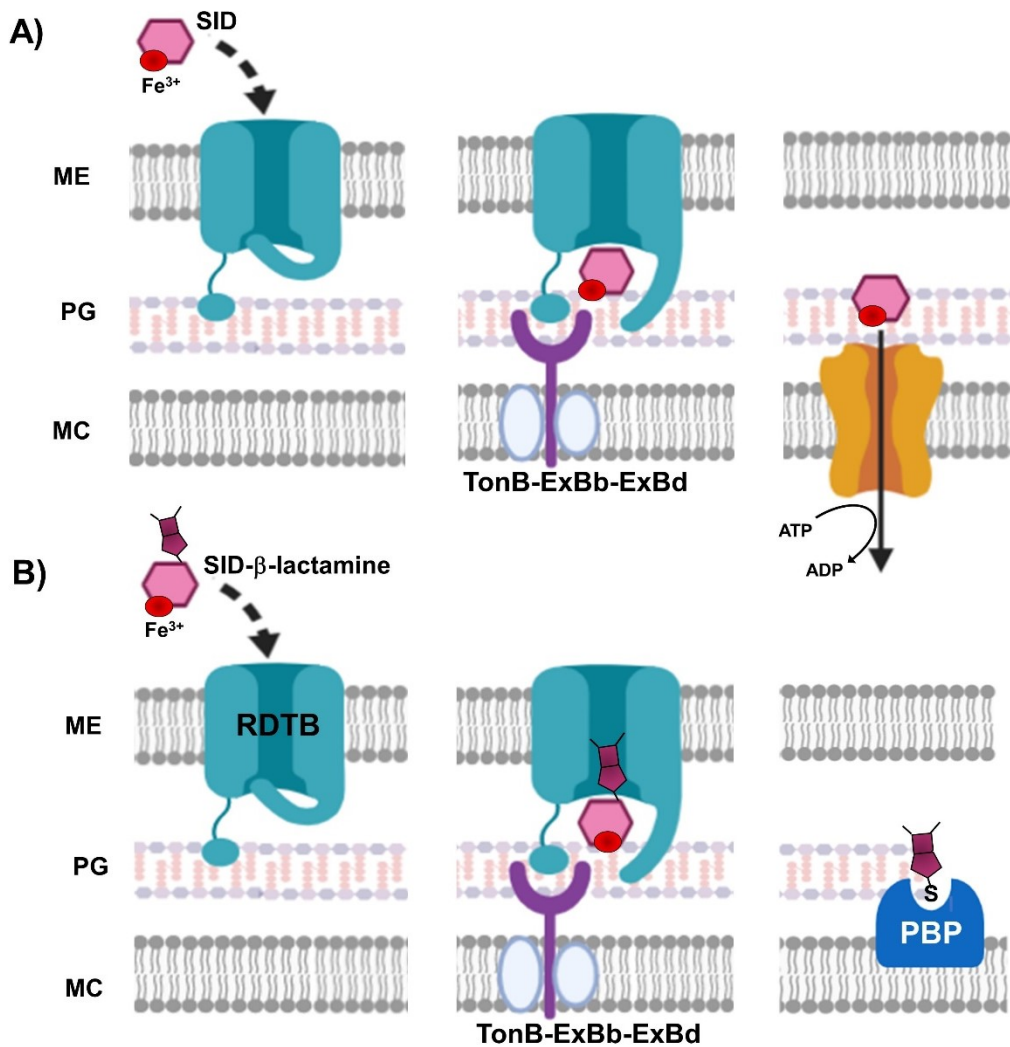


Figure 10. Schéma du transport des sidérophores et des sidérophores conjugués à une β -lactamine chez les bactéries à Gram⁻. Le sidérophore **A)**, ayant chélaté un ion Fe^{3+} lie un récepteur dépendant à TonB (RDTB) dans la membrane externe (ME) qui reconnaît sa structure. Le complexe TonB-ExBb-ExBd lie la partie en N-terminale du récepteur pour provoquer son ouverture et permettre la diffusion du sidérophore dans le périplasma. Pour passer la membrane cytoplasmique (MC), le sidérophore doit passer par un transport actif. Le sidérophore conjugué à une β -lactamine **B)**, emprunte la même voie, mais n'a pas à traverser dans le cytoplasme puisque les PBPs qui forment le peptidoglycane (PG) sont dans le périplasma. La partie antibiotique pourra acyler la cible et inhiber la synthèse. Le schéma est inspiré de Sheldon et al., (2016).

une concentration de 10^{-17} M (Andrews et al., 2003) et chez le mammifère de 10^{-24} M (Raymond et al., 1984) à pH 7,4. Cette forme pour être métabolisée par les bactéries doit être réduite sous forme Fe^{2+} . Pour y arriver, les sidérophores bactériens sont sécrétés et chélatent le Fe^{3+} qui peut alors être internalisé par les transporteurs spécifiques (Hider and Kong, 2010). L'entrée du fer est régulée par un domaine de quelques acides aminés qui ne peut être activé que par sa liaison au complexe TonB-ExBb-ExBd (Higgs et al., 1998). Ce complexe lie la partie N-terminale du transporteur qui adopte une conformation plus énergétique et ouverte (Postle and Larsen, 2007). Le sidérophore peut alors diffuser dans l'espace périplasmique des bactéries à Gram- et rejoindre un transporteur ABC pour son transport actif vers le cytoplasme où se trouve la réductase (Raymond et al., 2015). Pour les bactéries à Gram+ l'entrée se fait directement par la force proton motrice avec transporteurs ABC (Conroy et al., 2019). Une bactérie exprimera plusieurs transporteurs qui reconnaissent différentes structures de sidérophore. Afin d'augmenter l'import. *E. coli*, par exemple, exprimera des sidérophores qui reconnaîtront la forme hydroxamate (FhuA), la forme catécholate (FepA, Cir, Fiu) et le citrate (FecA) (McHugh et al., 2003). Dans un cas d'infection, la notion de compétition pour l'acquisition du fer prend de l'importance. D'abord puisque le pathogène infectant est en compétition avec la flore normale, avec d'autres pathogènes, mais aussi parce que le corps met en place des mécanismes de séquestration des éléments essentiels aux pathogènes pour limiter l'infection. C'est l'immunité nutritionnelle (Bilitewski et al., 2017).

Dans le cas du fer les deux principales protéines de séquestration du fer sont les transferrines, les lactoferrines et les ferritines dans les cellules (Braun and Killmann, 1999). Les sidérophores, dont la constante d'affinité surpasse celles de ces protéines, peuvent donc arracher le fer complexé (Raymond et al., 1984). La constante d'affinité dépend des groupements de coordination pour la chélation du fer. La coordination du fer requiert six coordinations. Un sidérophore ayant les six groupements est dit hexadentate et une seule molécule est nécessaire à la chélation. Généralement, ces sidérophores ont une constantes d'affinité supérieure aux sidérophores tétradentates ou bidentates. (Hider and Kong, 2010).

1.5.3 La régulation de l'import du fer

Bien que le fer soit essentiel à la croissance bactérienne, son transport dans la cellule bactérienne se doit d'être contrôlé puisque l'accumulation de la forme Fe^{2+} peut mener à une réaction avec les espèces réactives à l'oxygène (EROs) engendrées lors du métabolisme aérobie. Par exemple, par la réaction de Fenton, le Fe^{2+} peut réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour engendrer des radicaux hydroxyles (Woodmansee and Imlay, 2002). Cette accumulation devient

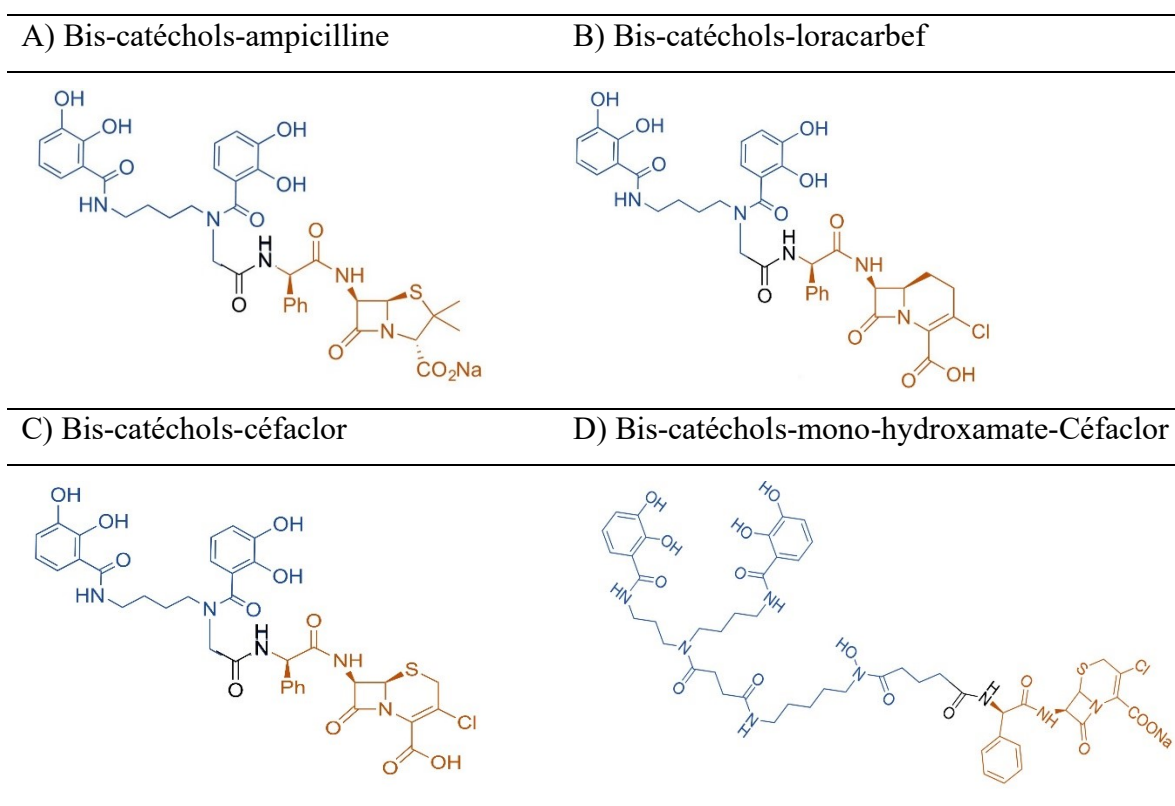


Figure 11. Schéma de quatre conjugués sidérophore- β -lactamine. En bleu est représenté la partie sidérophore qui pour en (A), (B) et (C) sont deux groupements bidentates (bis-catécholes) et en (D) un sidérophore hexadentate (bis-catécholes-mono-hydroxamate). En noir est le lien amide qui unit les deux parties des molécules. En rouge c'est la β -lactamine ; l'ampicilline (pénicilline) (A), le loracarbef (céphalosporine 2^e génération) (B), et le céfACLOR (céphalosporine de 2^e génération) en (C) et en (D). Les structures des conjugués nous ont été fournies par le Pr. Miller.

toxique pour la cellule bactérienne et cause l'inhibition de sa croissance. L'import de fer est donc régulé de différentes façons avec la protéine Fur principalement. Le *ferric uptake regulator* (Fur) est un répresseur transcriptionnel qui se dimérise à la suite de la liaison d'un ion Fe^{2+} sur ses deux monomères. Sous sa forme dimérisée, Fur peut lier l'ADN sur la boîte fur et inhiber la transcription des gènes en aval (Coy and Neilands, 1991). L'idée est de limiter l'expression de transporteurs du fer, la synthèse de sidérophore et prioriser l'expression de protéines qui utilise le fer (Braun, 2001). Cependant, lorsque la concentration Fe^{2+} intracellulaire diminue, Fur n'est plus sous forme de dimère et la répression se lève, favorisant l'expression de sidérophore et des différents transporteurs (Braun 2001, McHugh et al., 2003). C'est grâce à cette régulation que les conjugués SID- β L deviennent une avenue à exploiter pour augmenter la pénétration des antibiotiques conjugués. En fait, dû à l'immunité nutritionnelle chez les mammifères, la difficulté d'acquérir le fer nuit à la dimérisation de Fur. Ainsi, puisque Fur n'est pas dimérisé, aucune liaison à l'ADN est possible et ceci favorisera l'augmentation de l'expression de transporteurs et l'import des conjugués (Diarra et al., 1996, Liu et al., 2018). De plus, dû à la compétition accrue pour le fer, beaucoup d'espèces bactériennes expriment des transporteurs spécifiques à la structure de leur propre sidérophore, ainsi que certains récepteurs capables de reconnaître des structures de sidérophores étrangers. Par exemple, *E. coli* exprime le transporteur FepA qui reconnaît les groupements catéchols de l'entérobactine, mais possède aussi d'autres transporteurs qui reconnaissent la structure catéchol d'autres sidérophore. Cir et Fiu en sont des exemples. (Buchanan et al., 1999). Ceci procure l'avantage d'être plus compétitif dans un milieu pauvre en fer. Pour l'antibiothérapie, cela facilite la synthèse de conjugués puisque seule la partie chélatrice sera nécessaire à la reconnaissance et à l'internalisation et non pas l'ensemble de la structure (Curtis et al., 1988; Diarra et al., 1996). Ici, les sidérophores synthétisés par le professeur Marvin J. Miller (University of Notre Dame, IN, É-U) sont des bis-catéchol (figure 11 A, B et C) comportant quatre groupements de coordinations et un SID bis-catéchol-mono-hydroxamate comportant les six groupements comme représentés sur la figure 11 D (Wencewicz and Miller, 2013; Ghosh et al., 1996).

1.6 Hypothèses et objectifs de la recherche

La recherche décrite ici fait état de deux nouveaux types de β -lactamines. La première partie, sous forme d'article, vise à mieux documenter le mode d'action antibactérien du tébipénème, la forme active du tébipénème pivoxil. Cette carbapénème est en voie de devenir la première en Amérique du Nord à pouvoir être administrée oralement pour le traitement des infections urinaires compliquées. Sa formulation permet une meilleure accumulation au niveau du rein et une excrétion supérieure aux autres carbapénèmes dans l'urine. Puisqu'il s'agit d'une carbapénème, notre hypothèse principale était que son activité antibactérienne et son profil d'affinité pour les PBPs seraient équivalents aux carbapénèmes existantes. Pour le démontrer, nos objectifs étaient de :

1. Évaluer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la carbapénème envers les microorganismes cibles.
2. Mesurer l'affinité de la carbapénème pour chacune des *penicillin-binding proteins* (PBPs) des bactéries à Gram– et à Gram+.
3. Corréler l'affinité de la carbapénème pour chacune des PBPs avec l'effet physiologique observé en microscopie.

La deuxième partie du mémoire, sous forme classique, est un chapitre qui vise à démontrer le potentiel de revalorisation des β -lactamines par leur conjugaison à un sidérophore. L'hypothèse principale est que les conjugués augmenteront l'activité inhibitrice des antibiotiques conjugués. Pour le vérifier, mes objectifs visaient:

1. L'évaluation de l'effet de la privation en fer sur la croissance bactérienne et l'activité des différents conjugués.
2. L'établissement des profils d'inhibition de la croissance bactérienne par la mesure des CMIs des conjugués sidérophore- β -lactamine comparativement aux mêmes antibiotiques non conjugués.

CHAPITRE 2

ARTICLE SCIENTIFIQUE

2.1 Introduction de la publication

TITRE : *In Vitro* Activity of Tebipenem (SPR859) Against Penicillin-Binding Proteins of Gram-negative and Gram-positive Bacteria

AUTEURS: Évelyne Lacasse¹, Éric Brouillette¹, Audrey Larose¹, Thomas R. Parr Jr², Aileen Rubio² et François Malouin^{1*}

AFFILIATIONS: ¹Centre d'Étude et de Valorisation de la Diversité Microbienne (CEVDM), Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada J1K 2R1. ²Spero Therapeutics, Inc., 675 Massachusetts Ave, 14th Floor, Cambridge, MA, US 02139

2.1.1 Originalité et contribution à la science

Cet article établit pour la première fois la preuve de l'activité inhibitrice du tébipénème par la liaison aux PBPs tout en corrélant cet effet au phénotype observé en microscopie. Cette étude apporte un poids majeur au développement du tébipénème-pivoxil pour être la première carbapénème administrée oralement en Amérique du Nord facilitant le traitement des infections urinaires compliquées. L'article soumis était d'abord de forme traditionnelle, mais a été converti en un *short form*. Le matériel supplémentaire est donc d'une grande importance, puisque tous les profils de PBPs d'espèces (sauf *E. coli*) s'y retrouvent. D'ailleurs, le profil de PBPs de *K. pneumoniae* présenté ici fait partie des deux premiers profils publiés simultanément en 2018 (Sutaria et al., 2018).

DOI: 10.1128/AAC.02181-18

2.1.2 Contribution des auteurs

Évelyne Lacasse : auteure principale et principale manipulatrice. J'ai effectué la majorité des expériences sur les différentes espèces bactériennes. J'ai aussi écrit la majorité de l'article et fait les figures.

Éric Brouillette : Professionnel de recherche au laboratoire, Éric a beaucoup aidé pour les manipulations chez *E. coli* et l'obtention des premiers extraits membranaires. Il est celui qui m'a formé au départ pour me montrer les techniques expérimentales.

Audrey Larose : Audrey effectuait son deuxième stage au laboratoire. Je l'ai formé pour qu'elle puisse m'aider à faire les gels de PBPs et les CMI. Nous avons travaillé ensemble pour l'obtention des gels de *K. pneumoniae* et des extraits membranaires de *P. aeruginosa*.

Thomas R. Parr et Aileen Rubio : Principaux collaborateurs chez Spero Therapeutics Inc, Thomas (scientifique en chef) et Aileen (directrice du département de recherche biologique), nous ont fourni les antibiotiques à tester. Aileen a écrit une partie de l'introduction de l'article à propos de la forme prodrogue (SPR994) de la forme active (SPR859) : le tébipénème. Ils ont aussi révisé l'article pour le bon usage de l'anglais et ont permis la présentation des résultats au congrès de l'*American society of Microbiology (ASM microbe 2018)*.

François Malouin : François est le chercheur principal et l'auteur de correspondance qui a établi le contact avec Spero Therapeutics Inc. et élaboré le plan de l'étude. Il a supervisé les travaux et a aussi contribué à l'écriture de l'article et la révision finale.

Reference: Lacasse E., Brouillette E., Larose A., Parr TR., Rubio A., Malouin F. (2019). *In vitro* activity of tebipenem (SPR859) against penicillin-binding proteins of Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents and Chemother*, 63, doi: 10.1128/AAC.02181-18.

2.2 *In Vitro* Activity of Tebipenem (SPR859) Against Penicillin-Binding Proteins of Gram-negative and Gram-positive Bacteria

Evelyne Lacasse¹, Eric Brouillette¹, Audrey Larose¹, Thomas R. Parr Jr², Aileen Rubio² and François Malouin^{1*}

¹Centre d'Étude et de Valorisation de la Diversité Microbienne (CEVDM), Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada J1K 2R1.

²Spero Therapeutics, Inc., 675 Massachusetts Ave, 14th Floor, Cambridge, MA, US 02139

Submission to: Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Mechanisms of Action: Physiological Effects).

Running title: Binding of tebipenem (SPR859) to PBPs

Key words: Tebipenem, carbapenem, penicillin-binding protein, PBP

***Address correspondence and reprint requests to:**

François Malouin, PhD

Professor

Université de Sherbrooke

Département de biologie, Faculté des sciences,

2500 boul. Université,

Sherbrooke, QC, Canada J1K 2R1.

Tel: +1-819-821-8000, ext. 61202; Fax: +1-819-821-8049 ;

E-mail: francois.malouin@usherbrooke.ca

2.2.1 Abstract

Tebipenem (SPR859) is the microbiologically active form of SPR994, tebipenem-pivoxil, an orally available carbapenem with activity against extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae*. Measurement of the relative binding of SPR859 to the bacterial cell targets revealed that it is a potent inhibitor of multiple penicillin-binding proteins (PBPs), but primarily a Gram-negative PBP2 inhibitor, similar to other compounds in this class. These data support further clinical development of SPR994.

2.2.2 Methods, results and discussion

The β -lactam class of antibiotics have enjoyed a long track record of clinical efficacy and safety against many important pathogens, making these antibiotics a mainstay for treating patients suffering from many different types of bacterial infections (1). The carbapenem subclass possesses the broadest spectrum and stability to many clinically relevant β -lactamases (2). The broad-spectrum antibacterial activity of the carbapenems originates from low nanomolar potency against multiple penicillin binding proteins (PBPs) (3). Tebipenem (SPR859) is the microbiologically active form of SPR994, tebipenem-pivoxil, an orally available carbapenem with activity against extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* (4). Tebipenem-pivoxil is currently marketed only in Japan by Meiji Seika Pharma Co., as a fine granule formulation (Orapenem®) with indications for pediatric otitis media, sinusitis and pneumonia. A new oral formulation of tebipenem-pivoxil, SPR994, is currently under development to optimize the pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK/PD) profile for adult complicated urinary tract infection (cUTI) because of the recent increase in ESBL-producing *Enterobacteriaceae*, for which SPR859 is active. As expected of a carbapenem, tebipenem was found to be a potent inhibitor of multiple PBPs in pathogens like *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*, which translated to antimicrobial activity through cell wall synthesis inhibition (5, 6). In this work, we sought to characterize SPR859 activity against PBPs from pathogens typically found in cUTI, including *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*.

Tebipenem (SPR859), provided by Spero Therapeutics, was characterized *in vitro* by assessing its potency against putative target PBPs. The PBP binding and competition assay with the fluorescent reporter molecule Bocillin FL (Invitrogen-Molecular Probes, Eugene, OR) revealed the relative binding of test compounds for the different PBPs of each bacterial species investigated (7). Meropenem, avibactam, clavulanic acid and ceftazidime were purchased from USP (Rockville, MD) and amdinocillin and oxacillin from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). The strains used were *Escherichia coli* K12, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 as the Gram-negative test strains. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and 67-0 (8) were used as reference strains for methicillin-susceptible (MSSA) and methicillin-resistant (MRSA) strains, respectively.

Bacterial membranes for the PBP binding and competition assay with Bocillin FL were isolated and prepared according to previously published protocols (7, 9). Briefly, bacteria were cultured in a 1.5-L brain heart infusion broth (BHI; Becton Dickinson Canada Inc., Mississauga, ON, Canada) at 35 °C to an $A_{600\text{nm}}$ of ~1.0. For the heterogeneous MRSA strain 67-0, the culture was supplemented with 2 % NaCl and 5 µg/mL of nafcillin to induce a strong expression of PBP2a as previously described (8, 10). The bacterial cell pellets were collected and suspended in a 20 mM potassium phosphate-140 mM NaCl (KPN) buffer (pH 7.5). *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* cells were treated with lysozyme (400 µg/mL) for 1 h at 37 °C with gentle agitation, while lysostaphin (400 µg/mL) was used for *S. aureus* strains. DNase (10 µg/mL), RNase (10 µg/mL) and a protease inhibitors cocktail (Sigma-Aldrich) were added for another hour of incubation at 37 °C. Cells were then disrupted with a French pressure cell and membranes collected by centrifugation at 12 000 x g for 10 min to remove remaining unbroken cells. The supernatant was centrifuged at 150 000 x g for 40 min at 4 °C. The membrane pellet was suspended in a minimal volume (typically 300-500 µL of KPN buffer) and stored at –80°C. The protein concentration in the membrane preparations was estimated by the Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) using bovine serum albumin as a standard. The amount of membrane preparation used for each species and the final concentration of Bocillin FL used in the assay were selected so that the PBP banding patterns obtained on gels

reflected those previously published in the literature. In each assay mixture, 25 to 40 μg of membrane proteins were used for *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* and 5 to 10 μg were used for *S. aureus* ATCC 29213 and MRSA 67-0. Before the competition assay, membranes of the MRSA strain 67-0 were incubated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of clavulanic acid to saturate high-affinity PBPs and specifically reveal PBP2a (8, 10). For *S. aureus* ATCC 29213, labeling of PBP4 by Bocillin FL was possible by adding 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of avibactam for 10 min prior to the addition of the test antibiotic and the reporter molecule as previously described (9). For the competition, increasing concentrations of each test compound were first added for 10 min at 30 °C before Bocillin FL was added at a final concentration of 12.5 μM for an additional 20 min of incubation. Thereafter, reactions were stopped by adding the Laemmli-loading buffer (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) with freshly added β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). Prior to loading on gel, the reactions were heated 3 min at 100 °C.

For PBP visualization, membrane proteins from the competition assay mixtures were separated by electrophoresis using a SDS-polyacrylamide discontinuous gel system as previously described (9). To obtain the fluorescent PBP images, gels were scanned by the Typhoon FLA 9500 instrument (GE-Healthcare Bio-Sciences Inc., Baie D'urfee, Qc, CA) using a 488 nm excitation wavelength (emission 520-530 nm) corresponding to the peak absorption of Bocillin FL. The volume (intensity \times constant area) of each PBP band was then measured using the Quantity One 1-D analysis software (version 4.6.6 ; Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). The IC_{50} (or relative binding of test compound) for each PBP was defined as the antibiotic concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) needed to reduce by 50% the binding of Bocillin FL. IC_{50} data were obtained from at least three independent PBP binding assays using three different sets of antibiotic concentrations. Unlabeled membranes (no BoFL and antibiotic) were also included in each gel electrophoresis to reveal non-specific autofluorescent bands that are not PBPs. The identification and designation of each PBP band revealed by the binding of Bocillin FL matched PBP profiles from the scientific literature and was confirmed notably by competition assays with control antibiotics having well-known PBP binding preferences. For example, amdinocillin

Tableau 2. Binding of antibiotics to PBPs of Gram-negative bacteria

Relative binding (IC ₅₀ [μg/mL]) for PBP ^b :										
Species	Compound ^a	MICs (μg/mL)	1a	1b	1a/b	2	3	4	5	5/6
<i>E. coli</i> K12	AMD	0.12-0.25			>20	0.040 ± 0.0090	>20	>20		>20
	CAZ	0.25			2.56 ± 1.90	>20	0.11 ± 0.018	>20		>20
	MEM	0.03			2.59 ± 1.66	0.015 ± 0.0039	0.45 ± 0.42	0.31 ± 0.0088		2.10 ± 1.21
	SPR859	0.015-0.03			3.94 ± 0.96	0.022 ± 0.0066	0.56 ± 0.28	0.65 ± 0.25		2.07 ± 1.02
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	AMD	512			>20	0.055 ± 0.017	>20	>20		>20
	CAZ	0.25			1.38 ± 0.24	>20	0.065 ± 0.026	>20		>20
	MEM	0.03-0.06			1.50 ± 0.77	0.010 ± 0.0035	0.16 ± 0.040	0.011 ± 0.0064		3.31 ± 1.12
	SPR859	0.06-0.12			1.34 ± 0.84	0.013 ± 0.0083	0.92 ± 0.31	0.019 ± 0.013		3.31 ± 0.95
<i>P. aeruginosa</i> ^c ATCC 27853	AMD	256	>20	>20		0.34 ± 0.11 ^c	>20	>20	>20	
	CAZ	2	0.043 ± 0.021	0.97 ± 0.12		>20	0.0096 ± 0.0043	2.61 ± 1.89	>20	
	MEM	0.25-1	0.69 ± 0.29	0.15 ± 0.026		0.026 ± 0.018	0.0094 ± 0.0029	0.049 ± 0.031	4.77 ± 0.43	
	SPR859	2	0.36 ± 0.18	1.94 ± 1.17		0.015 ± 0.012	0.031 ± 0.019	0.040 ± 0.022	3.84 ± 2.02	

^a CAZ, ceftazidime ; AMD, amdinocillin ; MEM, meropenem

^b A >sign preceding a value indicates that the IC₅₀ was greater than the highest dose tested.

^c The IC₅₀ for PBP2 of *P. aeruginosa* was measured by including the SDS-PAGE comigrating autofluorescent protein to the background

has a very selective binding for *E. coli* PBP2 (11), whereas ceftazidime binds primarily PBP3 and PBP1a/1b (12). The effective concentration of the test β -lactams that prevents binding of Bocillin FL to PBPs by 50% under the assay conditions (IC_{50}) are reported in Table 1. Carbapenems like meropenem are known to display a broad-spectrum affinity for PBPs (3). As SPR859 is also a carbapenem, we used meropenem as a comparator for the *E. coli* PBPs binding patterns observed in competition with Bocillin FL (Fig. 12). As expected, SPR859

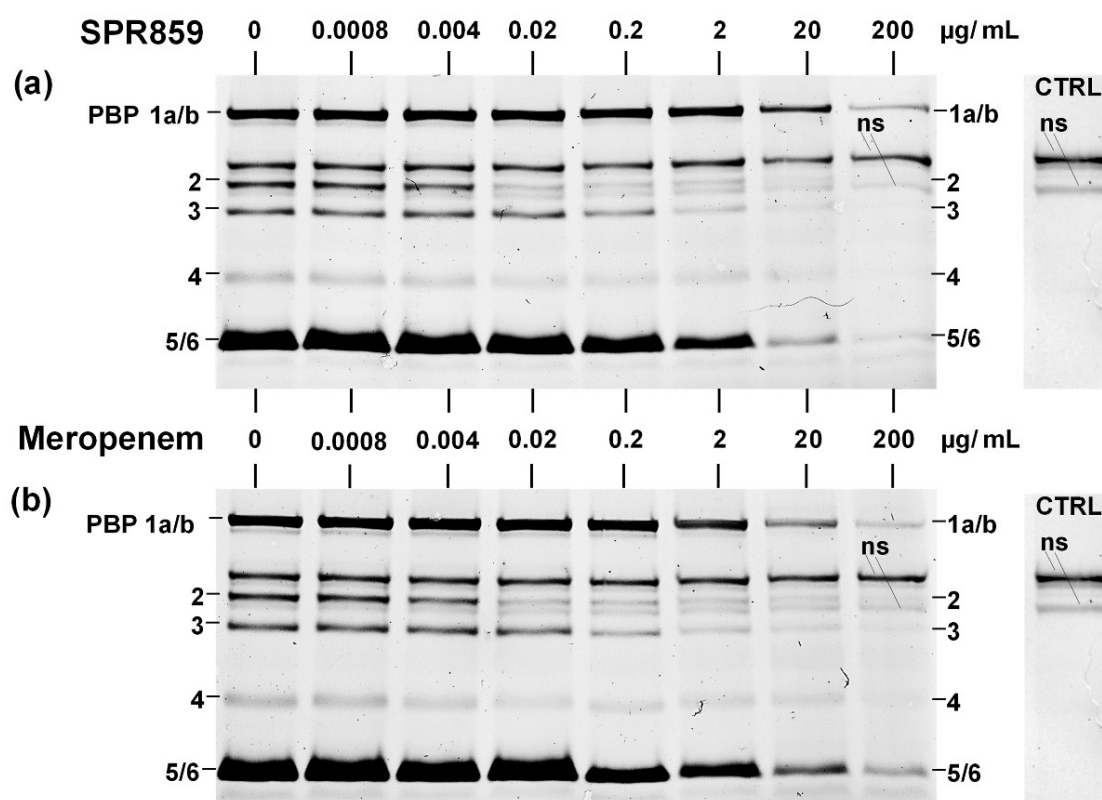


Figure 12. PBP binding competition assay between Bocillin FL and SPR859 (a) or meropenem (b) using *E. coli* K12 cell membranes. The fluorescent Bocillin FL signal decreases with increasing antibiotic concentrations. The calculated IC_{50} are reported in Table 1. The control (CTRL) are the unlabeled membranes (no Bocillin FL and antibiotic), showing non-specific (ns) autofluorescent bands that are not PBPs.

bound all *E. coli* PBPs and IC_{50} measurements were similar to those obtained for meropenem (Tableau 2). Meropenem PBP binding were in turn consistent with published data (13). PBP2

was the main target of SPR859 for *E. coli* and *K. pneumoniae* (Table 1; see also Fig. S1 for *K. pneumoniae* PBP profiles). As for amdinocillin and meropenem, the MIC of SPR859 correlated well with the IC₅₀ for *E. coli* PBP2 (Table 1). The exception was *K. pneumoniae* showing a very low amdinocillin IC₅₀ for PBP2 but a MIC of 512 µg/mL for that antibiotic (Table 1). MICs were measured by using a broth microdilution technique following the Clinical laboratory standards institute guidelines (14). The mechanism for amdinocillin resistance in *K. pneumoniae* is not well understood. Resistance is partly explained by the fact that *K. pneumoniae* ATCC 13883 produces a SHV-1 β-lactamase (15). In presence of 2 µg/mL clavulanic acid, the MIC of ampicillin for *K. pneumoniae* dropped from 256 to 4 µg/mL and that of amdinocillin from 512 to 32 µg/mL (data not shown). The MIC of clavulanate was 64 µg/mL. Thus, SHV-1 inhibition affects *K. pneumoniae* susceptibility to amdinocillin, the enzyme may not be the only factor contributing to resistance. In *E. coli* amdinocillin resistance also involves the stringent response (16) and mutations that counteract the toxic effect of the futile cycle of peptidoglycan synthesis induced by amdinocillin (17). Nevertheless, microscopy confirmed inhibition of PBP2 by amdinocillin, meropenem and SPR859 in bacterial cells (Fig. 13). Indeed, exposure of *E. coli* cells to PBP2 inhibitors like amdinocillin causes rounding of cells (11), as this PBP is involved in cell elongation and rod shape maintenance (18). Besides, SPR859 and meropenem also had good binding to PBP3. Binding to PBPs 1a/b was equivalent for SPR859, meropenem and ceftazidime, but ceftazidime had no significant binding to PBPs 4 and 5/6, as previously reported (19), compared to SPR859 and meropenem. Preferential binding to PBP3 by ceftazidime provoked cell filamentation both in *E. coli* and *P. aeruginosa* (Fig. 13) as this PBP is involved in septation in *E. coli* (18) and is closely related in function in *P. aeruginosa* (20). While both *E. coli* (Fig. 13) and *K. pneumoniae* (data not shown) present rounding of cells when exposed to amdinocillin, meropenem and SPR859, *P. aeruginosa* morphological changes included filament bulging and presence of cells having a conical shape in the presence of the carbapenems (Fig. 13). This may represent the dual action of the carbapenems on both PBP2 and PBP3 in *P. aeruginosa* (19). Indeed, SPR859 showed high binding to both *P. aeruginosa* PBP2 and PBP3 (Table 1; see also Fig. S2 for *P. aeruginosa* PBP profiles). Recently, the essentiality of *P. aeruginosa* PBP3 was demonstrated (21), while the essential role of PBP2 for this species is questioned since some mutants lacking this PBP are viable (22). Note that PBPs

are designated according to their relative electrophoretic motility and that the same PBP designation across phylogenetically distant species does not necessarily imply that they are orthologs (18, 20).

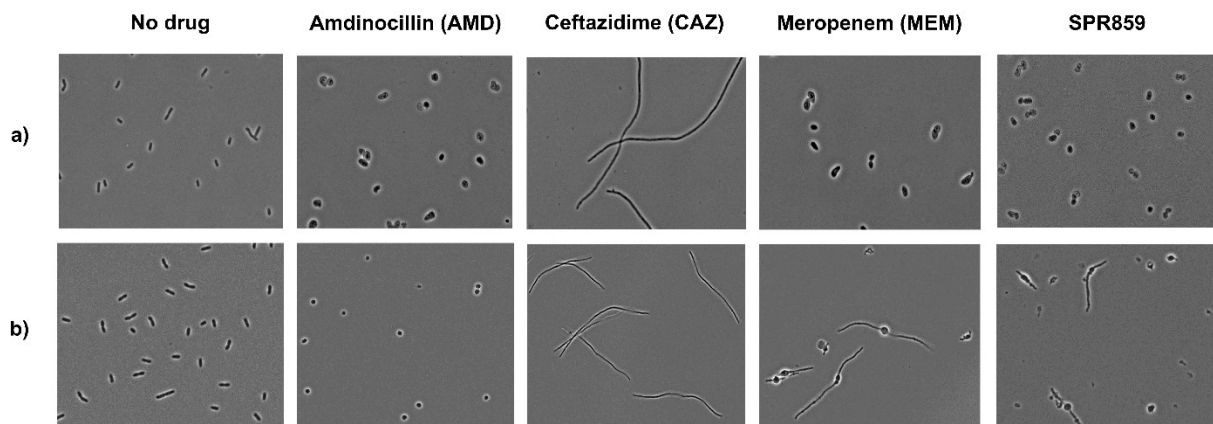


Figure 13. Microscopy of *E. coli* K12 (a) and *P. aeruginosa* ATCC 27853 (b) incubated with 1×MIC of the indicated antibiotics, for 4 h. Paraformaldehyde 1% was used to fix the cells before phase contrast microscopy. CAZ mainly targets the PBP3 (Table 2), leading to cell filamentation. AMD, MEM and SPR859 target PBP2 causing the rounding of the cells for *E. coli* K12. AMD caused a similar morphological change in *P. aeruginosa* ATCC 27853, but conical shaped cells and filament bulging are observed with MEM and SPR859.

The tested antibiotics showed different relative binding affinities for the PBPs of the Gram-positive *S. aureus*. Figure S3 shows that the carbapenems meropenem and SPR859 bind to all PBPs. For SPR859, the IC₅₀ for PBP1 and PBP4 were as low as 0.027 ± 0.018 µg/mL and 0.017 ± 0.001 µg/mL, respectively, and those values correlated with the antibiotic MIC for *S. aureus* ATCC 29213 (Table 2). Note that as described before (8), better visualization of PBP4 on *S. aureus* PBP banding patterns was enhanced using the β-lactamase inhibitor avibactam during the competition assay with Bocillin FL (Fig. S3). To a lesser degree, *S. aureus* PBP2 and PBP3 were also targets of SPR859. This was similar to that found for meropenem (Table 2). Yang *et al.* (23) showed the same relative binding of meropenem to PBP2 and PBP3 although it was reported that formation of the meropenem-PBP3 acylenzyme may have a short half-life and thus increasing its relative IC₅₀ value in PBP binding assays (24). Oxacillin on the contrary displays

Tableau 3. Binding of antibiotics to PBPs of *S. aureus* ATCC 29213 and MRSA 67-0

Species	Compound ^a	MICs (µg/mL)	Relative binding (IC ₅₀ [µg/mL]) for PBP ^b :				
			1	2	2a	3	4
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	OXA	0.25-0.5	0.058 ± 0.015	0.81 ± 0.25	NA	0.086 ± 0.050	>20
	MEM	0.12-0.5	0.047 ± 0.032	0.54 ± 0.24	NA	1.43 ± 0.45	0.0057 ± 0.0026
	SPR859	0.03-0.12	0.027 ± 0.018	0.53 ± 0.32	NA	1.01 ± 0.46	0.017 ± 0.00058
MRSA 67-0	OXA	256	ND	ND	440 ± 79	ND	ND
	MEM	32-64	ND	ND	167 ± 8	ND	ND
	SPR859	8-16	ND	ND	45 ± 15	ND	ND

^a OXA, oxacillin ; MEM, meropenem ; NA: not available; ND: not determined.

^b A >sign preceding a value indicates that the IC₅₀ was greater than the highest dose tested

good binding for PBP1, 2, and 3 but shows very little binding to PBP4 (Table 2). The binding profile of oxacillin to *S. aureus* PBPs was consistent to other published results (10). Using light microscopy, the morphological changes observed for *S. aureus* in presence of all antibiotics tested were equivalent (small enlargement of cells; Fig. S4) showing that binding of carbapenems to PBP4 (as opposed to that seen with oxacillin) did not contribute to this effect.

In *S. aureus*, the presence of the low-affinity PBP2a provides resistance to β -lactam antibiotics and is present in clinical isolates of MRSA but not in MSSA. PBP2a transpeptidase activity supports cell growth and viability even in the presence of β -lactam concentrations that inhibit PBPs 1-4 (25), and the MICs of these antibiotics thus correlates with their relative binding to PBP2a (Table 2; see also Fig. S5 for MRSA PBP2a profiles). Against MRSA, SPR859 was superior to meropenem based on its MIC and IC₅₀ for PBP2a (Table 2 and Fig. S5) but both induced cell enlargement like oxacillin when used at their MICs (Fig. S4). Still, SPR859 cannot be compared to anti-MRSA β -lactams like ceftobiprole (12) or ceftaroline (10) in terms of relative efficacy.

In conclusion, SPR859 was found to be a potent inhibitor of multiple PBPs among clinically important bacteria, but primarily a PBP2 inhibitor in *Enterobacteriaceae*, similar to other compounds in the carbapenem class. These data support further clinical development of SPR994 to become the first oral carbapenem for treatment of serious Gram-negative infections.

2.2.3 Acknowledgments

We thank Mike Pucci and Meiji Seika Pharma Co., Ltd. for their critical review. This study was supported by a research contract between Université de Sherbrooke and Spero Therapeutics Inc. This work was also supported by a team grant from the *Fonds de Recherche du Québec-Nature et Technologies* (FRQNT) to F. Malouin. E. Lacasse received a studentship from FRQNT. The funders had no role in data collection and interpretation.

2.2.4 References

1. Demain AL, Elander RP. 1999. The β -lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie van Leeuwenhoek* 75:5-19.
2. El-Gamal MI, Brahim I, Hisham N, Aladdin R, Mohammed H, Bahaaeldin A. 2017. Recent updates of carbapenem antibiotics. *Eur J Med Chem* 131:185–195.
3. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, Noreddin AM, Karlowsky JA. 2007. Comparative review of the carbapenems drugs. *Drugs* 67:1027–1052.
4. Jain A, Utley L, Parr TR, Zabawa T, Pucci MJ. 2018. Tebipenem, the first oral carbapenem antibiotic. *Expert Rev Anti Infect Ther* 16:513-522.
5. Yamada M, Watanabe T, Baba N, Takeuchi Y, Ohsawa F, Gomi S. 2008. Crystal structures of biapenem and tebipenem complexed with penicillin-binding proteins 2X and 1A from *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 52:2053–2060.
6. Hikida M, Itahashi K, Igarashi A, Shiba T, Kitamura M. 1999. *In vitro* antibacterial activity of LJC 11,036, an active metabolite of L-084, a new oral carbapenem antibiotic with potent antipneumococcal activity. *Antimicrob Agents Chemother* 43:2010-2016.
7. Zhao G, Meier TI, Kahl SD, Gee KR, Blaszcak LC. 1999. Bocillin FL, a sensitive and commercially available reagent for detection of penicillin-binding proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1124–1128.
8. Chambers HF, Sachdeva M. 1990. Binding of β -lactam antibiotics to penicillin-binding proteins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 161:1170-1176.
9. Asli A, Brouillette E, Krause KM, Nichols WW, Malouin F. 2016. Distinctive binding of avibactam to penicillin-binding proteins of Gram-negative and Gram-positive bacteria.

Antimicrob Agents Chemother 60:752–756.

10. Moisan H, Pruneau M, Malouin F. 2010. Binding of ceftaroline to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 65:713–716.
11. Spratt BG. 1977. Comparison of the binding properties of two 6 β -amidinopenicillanic acid derivatives that differ in their physiological effects on *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 11:161-166.
12. Davies TA, Page MGP, Shang W, Andrew T, Kania M, Bush K. 2007. Binding of ceftobiprole and comparators to the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 51:2621–2624.
13. Neu HC, Novelli A, Chin NX. 1989. *In vitro* activity and b-lactamase stability of a new carbapenem, SM-7338. Antimicrob Agents Chemother 33:1009–1018.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; CLSI approved standard M07-A10. 10th edition. CLSI, Wayne, PA.
15. Hægglman S, Löfdahl S, Paauw A, Verhoef J, Brisse S. 2004. Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 48:2400–2408.
16. Vinella D, D'Ari R, Jaffé A, Boulloc P. 1992. Penicillin binding protein 2 is dispensable in *Escherichia coli* when ppGpp synthesis is induced. EMBO J 11: 1493-1501.
17. Lai GC, Cho H, Bernhardt TG. 2017. The mecillinam resistome reveals a role for peptidoglycan endopeptidases in stimulating cell wall synthesis in *Escherichia coli*. PloS Genet 13:e1006934.12.

18. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. 2008. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 32:234-258.
19. Davies TA, Shang W, Bush K, Flamm RK. 2008. Affinity of doripenem and comparators to penicillin-binding proteins in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1510–1512.
20. Goffin C, Ghuysen J-M. 1998. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62:1079-1093.
21. Chen W, Zhang YM, Davies C. 2017. Penicillin-Binding Protein 3 is essential for growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 61:1–15.
22. Legaree BA, Daniels K, Weadge JT, Cockburn D, Clarke AJ. 2007. Function of penicillin-binding protein 2 in viability and morphology of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 59:411–424.
23. Yang Y, Bhachech N, Bush K. 1995. Biochemical comparison of imipenem, meropenem and biapenem: permeability, binding to penicillin-binding proteins, and stability to hydrolysis by β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 35:75–84.
24. Sumita Y, Fukasawa M, Okuda T. 1990. Affinities of SM-7338 for penicillin-binding proteins and its release from these proteins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 34:484–486.
25. Peacock SJ, Paterson GK. 2015. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Biochem* 84:577-601.

2.2.5 Supplemental material

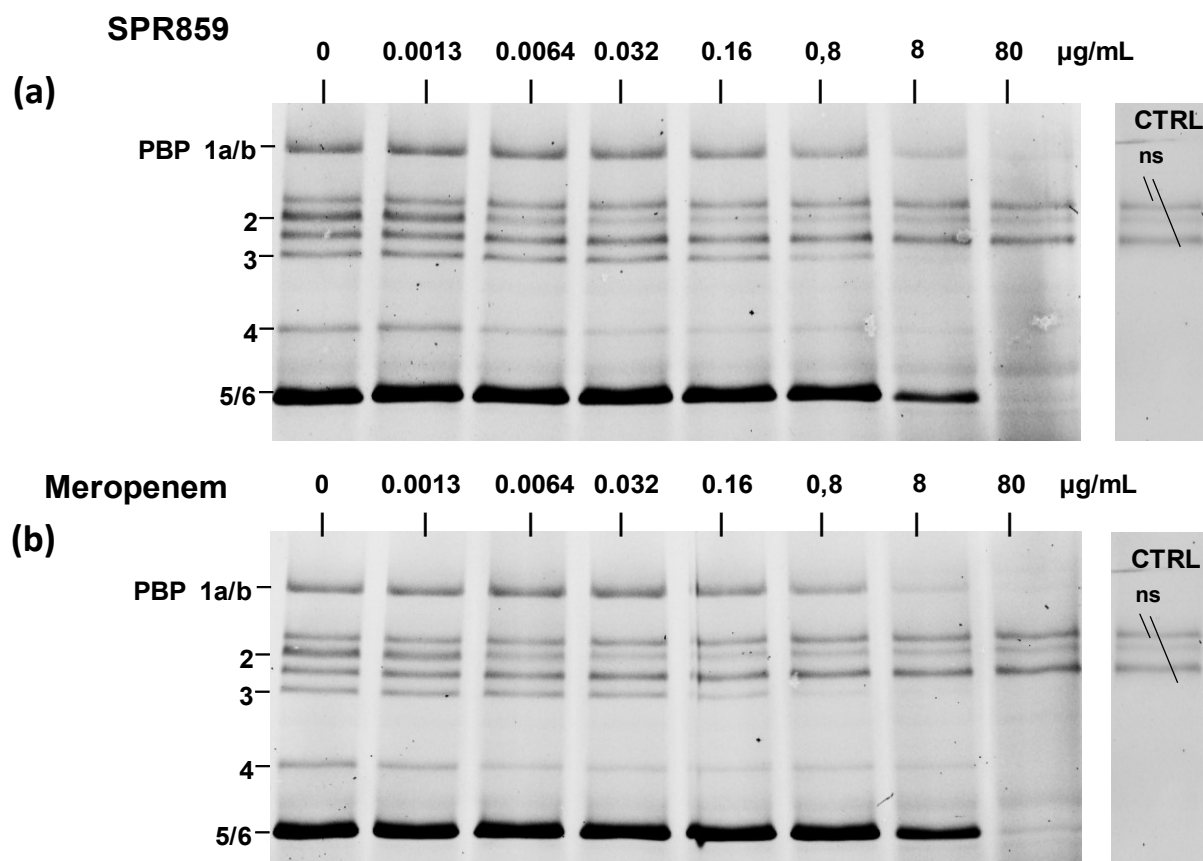


Figure S1. PBP binding competition assay between Bocillin FL and SPR859 (a) or meropenem (b) using *K. pneumoniae* 13883 cell membranes. The fluorescent Bocillin FL signal decreases with increasing antibiotic concentrations. The calculated IC_{50} are reported in Table 1. The control (CTRL) are the unlabeled membranes (no Bocillin FL and antibiotic), showing non-specific (ns) autofluorescent bands that are not PBPs.

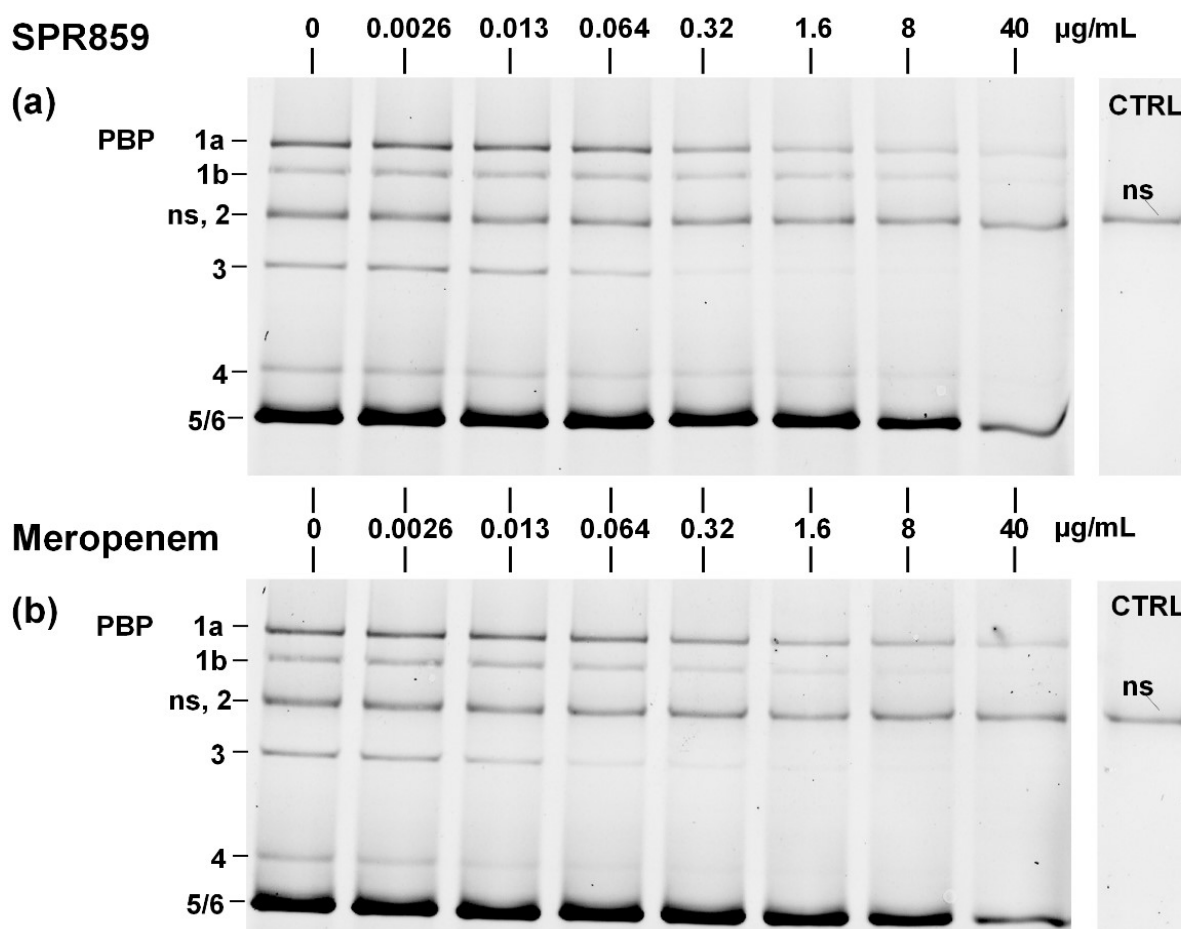


Figure S2. PBP binding competition assay between Bocillin FL and SPR859 (a) or meropenem (b) using *P. aeruginosa* 27853 cell membranes. The fluorescent Bocillin FL signal decreases with increasing antibiotic concentrations. The calculated IC_{50} are reported in Table 1. The control (CTRL) are the unlabeled membranes (no Bocillin FL and antibiotic), showing a non-specific (ns) autofluorescent band that is not a PBP and which co-migrates with PBP2. To measure the PBP2 IC_{50} the non-specific fluorescent band was included in the background.

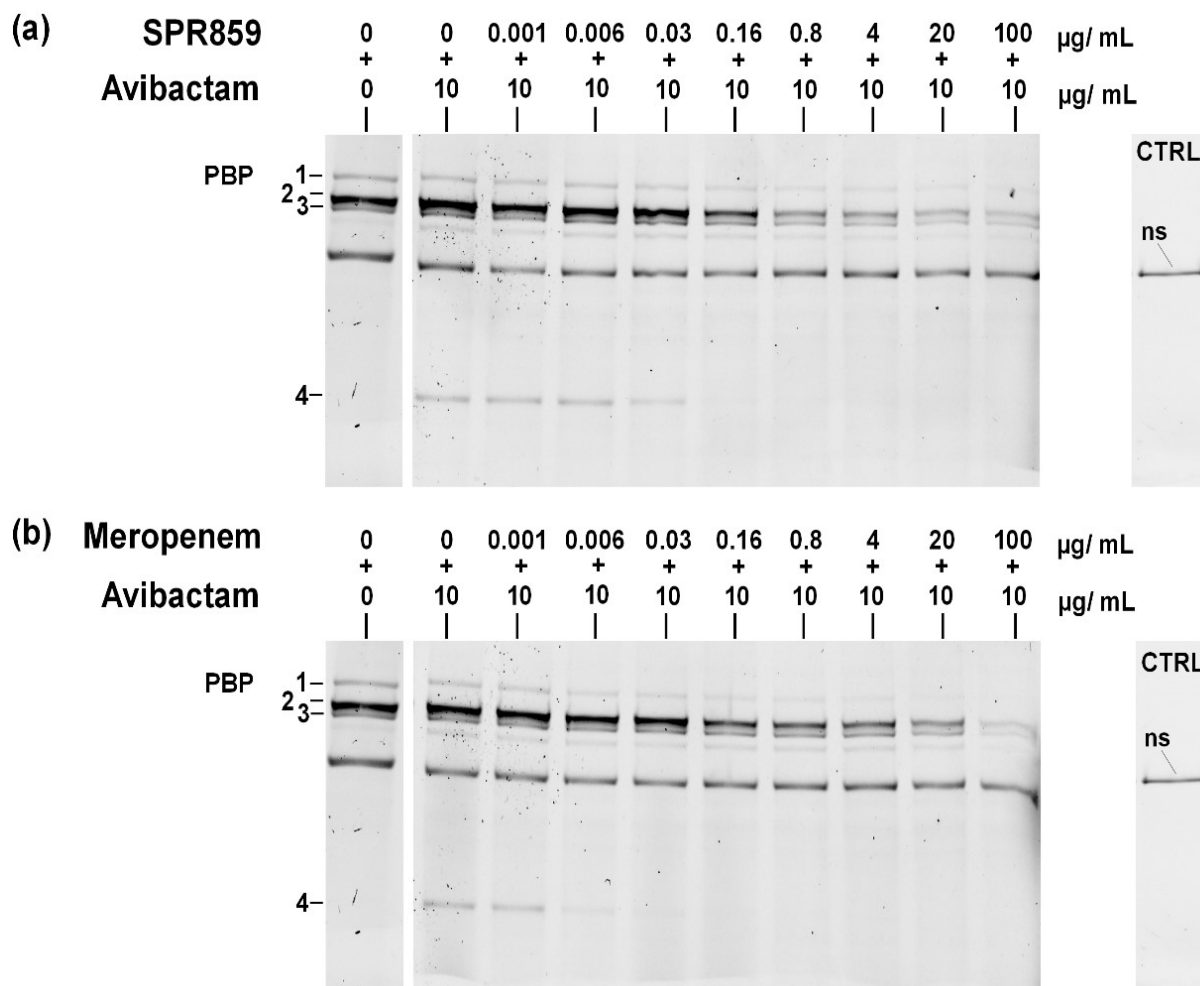


Figure S3. PBP binding competition assay between Bocillin FL and SPR859 (a) or meropenem (b) using *S. aureus* ATCC 29213 membranes. Avibactam was added to visualize PBP4 (1). The fluorescent Bocillin FL signal decreases with increasing antibiotic concentrations. The calculated IC_{50} are reported in Table 2. The control (CTRL) are the unlabeled membranes (no Bocillin FL and antibiotic), showing a non-specific (ns) autofluorescent band that is not a PBP.

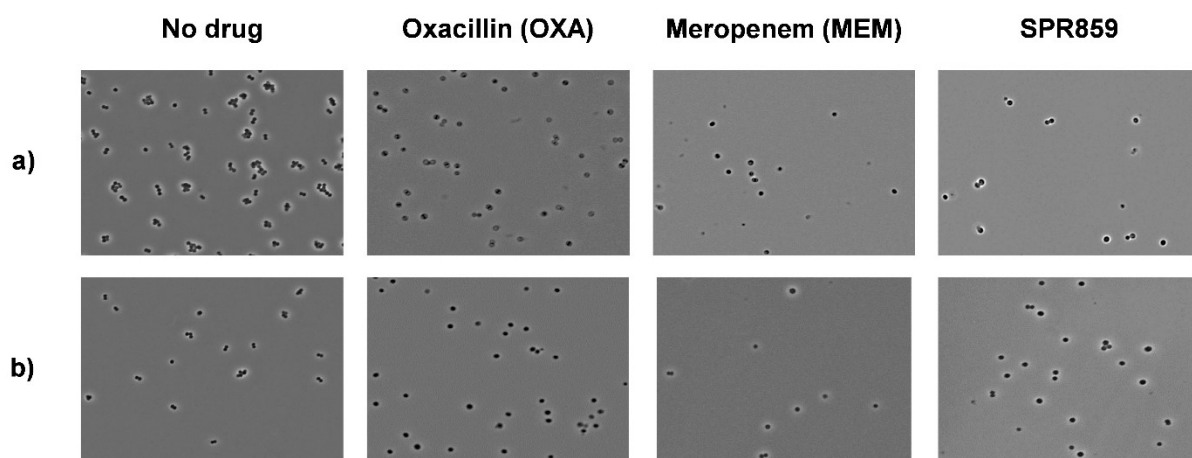


Figure S4. Microscopy of *S. aureus* ATCC 29213 (a) and MRSA 67-0 (b) incubated with 1×MIC of the indicated antibiotics, for 4 h. Paraformaldehyde 1% was used to fix the cells before phase contrast microscopy.

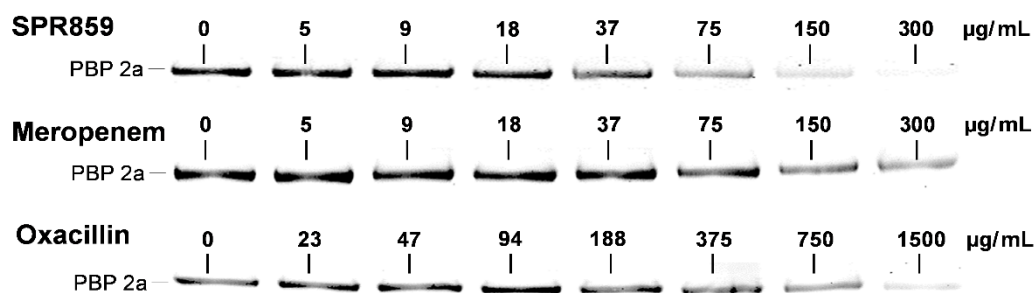


Figure S5. PBP2a binding competition assay between Bocillin FL and meropenem, SPR859 or oxacillin using MRSA 67-0 membranes pre-incubated with clavulanic acid. The fluorescent Bocillin FL signal decreases with increasing antibiotic concentrations. The calculated IC_{50} are reported in Table 2.

Reference

1. Asli A, Brouillette E, Krause KM, Nichols WW, Malouin F. 2016. Distinctive binding of avibactam to penicillin-binding proteins of Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 60:752–756.

CHAPITRE 3

L'ACTIVITÉ INHIBITRICE DE CONJUGUÉS SIDÉROPHORE- β -LACTAMINE

3.1 Matériel et méthodes

3.1.1 Antibiotiques et composés

Les quatre conjugués SID- β LS (bis-catéchols-ampicilline, bis-catéchol-loracarbef, bis-catéchol-céfaclor et le bis-catéchol-mono-hydroxamate-céfaclor) testés dans cette étude ont été synthétisés par l'équipe du professeur Marvin Miller (University of Notre Dame, IN, É.-U.). Ceux-ci ont aussi fourni le loracarbef, le céfaclor et les sidérophores seuls (bis-catéchol et bis-catéchol-mono-hydroxamate). L'ampicilline MIC et le chelex[®] 50-100 mesh proviennent de Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Les antibiotiques et les inhibiteurs ont été dilués tels que décrits dans le CLSI (CLSI M100, 2018). Puis, les conjugués ont été dilués dans un volume minimal de tampon potassium-phosphate 0,1 M à pH 8, puis complété avec un tampon potassium-phosphate 0,1 M à pH 6. Les sidérophores seuls étaient dilués dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). Tous les composés étaient à une concentration minimale de 5 mg/mL.

3.1.2 Les souches bactériennes

Des souches de références ont été utilisées pour obtenir un profil d'activité des conjugués selon l'espèce. D'abord, quatre espèces de bactéries provenaient de la banque *American type culture collection* (ATCC) : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* 29213 et *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606.

3.1.3 Les milieux de culture

Les bactéries étaient cultivées sur TSA à partir de la réserve avant d'être plongées dans un bouillon *Mueller-Hinton broth cation adjusted* (MHBCA) (Becton Dickinson Canada Inc. Mississauga, ON, Canada) déprivé en fer (MHBCA-DF) ou non. Pour retirer le fer, la méthode récemment approuvée par le CLSI a été effectuée (Huband et al., 2017 ; Hackel et al., 2019). D'abord, du chelex® 50-100 mesh sous forme résine était ajouté à 10 % p/v au milieu stérile MHBCA et agité pour 2 heures, afin de s'assurer de la pleine déplétion (Hackel et al., 2019; Domingue et al., 1990). Le milieu était ensuite filtré sur filtre 0,2 µm pour retirer la résine ayant chélatée les ions multivalents, dont le Fe^{3+} , à grande affinité. Le pH du milieu était ensuite ajusté à 7,3 avec de l'acide chloridrique 1 M puis supplémenté avec les ions Ca^{2+} , Mg^{2+} et Zn^{2+} à une concentration de 25 µg/mL, 12 µg/mL et 1 µg/mL respectivement. Le tout était filtré à 0,2 µm pour s'assurer de la stérilité.

3.1.4 Les courbes de croissance

Pour évaluer l'impact de la déplétion en fer, des tests de croissances étaient effectués en milieu déprivé en fer, puis en concentration croissante de Fe^{3+} (FeCl_3). Les concentrations de 0,01, 0,1, 1, 10 µg/mL de Fe^{3+} et le milieu non déplété MHBCA ont été testés. Dans une plaque 96 puits, la croissance était mesurée en duplicata pour chaque espèce et l'expérience a été faite en triplicata. Du milieu auquel était ajouté la solution de FeCl_3 à toutes les concentrations testées étaient ajoutées comme témoin pour s'assurer qu'il n'y ait pas de précipités. Le Fe^{3+} était ajouté au MHBCA-DF à 2x la concentration finale. Puis, chaque espèce bactérienne diluée à une concentration entre 10^5 et 10^6 CFU/mL était ajouté aux puits et dénombré sur pétri TSA. Trois puits étaient consacrés au témoin de croissance dans le MHBCA et le MHBCA-DF. La croissance était mesurée par densité optique aux temps: 0, 4, 6, 8, 12 et 24 h à 600 nm et des comptes de viabilité ont été effectué pour chaque puits après 24 h. Les graphiques de croissance de la densité optique selon le temps ont été tracées sur GraphPad Prism version 8.2.1. Chaque colonne était formée par la moyenne de duplicata biologique comportant chacune un triplicata

technique. La significativité était mesurée par un *two-way* anova en comparaison multiple avec le MHBCA contrôle non déplété où * ; $p < 0,05$, ** ; $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

3.1.5 Les tests de concentrations minimales inhibitrices

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été mesurées selon les recommandations du CLSI (CLSI, 2018). Brièvement dans une plaque 96 puits, les antibiotiques testés sont dilués (dilutions doublantes) à 2x la concentration en μM . Les bactéries cultivées sur pétri sont ajustées à un Macfarland 0,5 puis dilué pour atteindre une concentration entre 10^5 et 10^6 CFU/mL, puis ajoutées aux puits pour obtenir la concentration finale. Un témoin négatif de milieu seul, ainsi qu'un témoin de croissance sans antibiotique sont ajoutés. Les antibiotiques seuls comme l'ampicilline, le céfador et le loracarbef ont des CMI connues et servaient de témoins en plus. Les mesures étaient prises après une incubation de 24 h à 35°C .

3.2 Résultats

3.2.1 Les courbes de croissance

Afin de s'assurer que la déplétion en fer est bien le caractère limitant du milieu, les courbes de croissances ont été effectuées avec le milieu déplété et ce même milieu auquel était ajoutée une solution croissante de Fe^{3+} . Pour toutes les espèces, les défauts de croissance s'observaient principalement avec une DO_{600} significativement inférieure après 24 h de croissance entre le MHBCA-DF et le MHBCA non déplété. La figure 14 illustre le fait que l'ajout croissant de Fe^{3+} permet de rétablir la croissance de toutes les espèces bactériennes testées. Les différences de croissances s'observent à partir de 12 h, mis à part *K. pneumoniae* et *E. coli* où le défaut de croissance s'observe à 24 h. L'ajout d'une concentration de $1 \mu\text{g/mL}$ de Fe^{3+} a rétablie la croissance au niveau du MHBCA de toutes les espèces à Gram-, alors que $10 \mu\text{g/mL}$ était nécessaire à *S. aureus* après 24 h. À $10 \mu\text{g/mL}$, la croissance n'est pas affectée et surpasse même

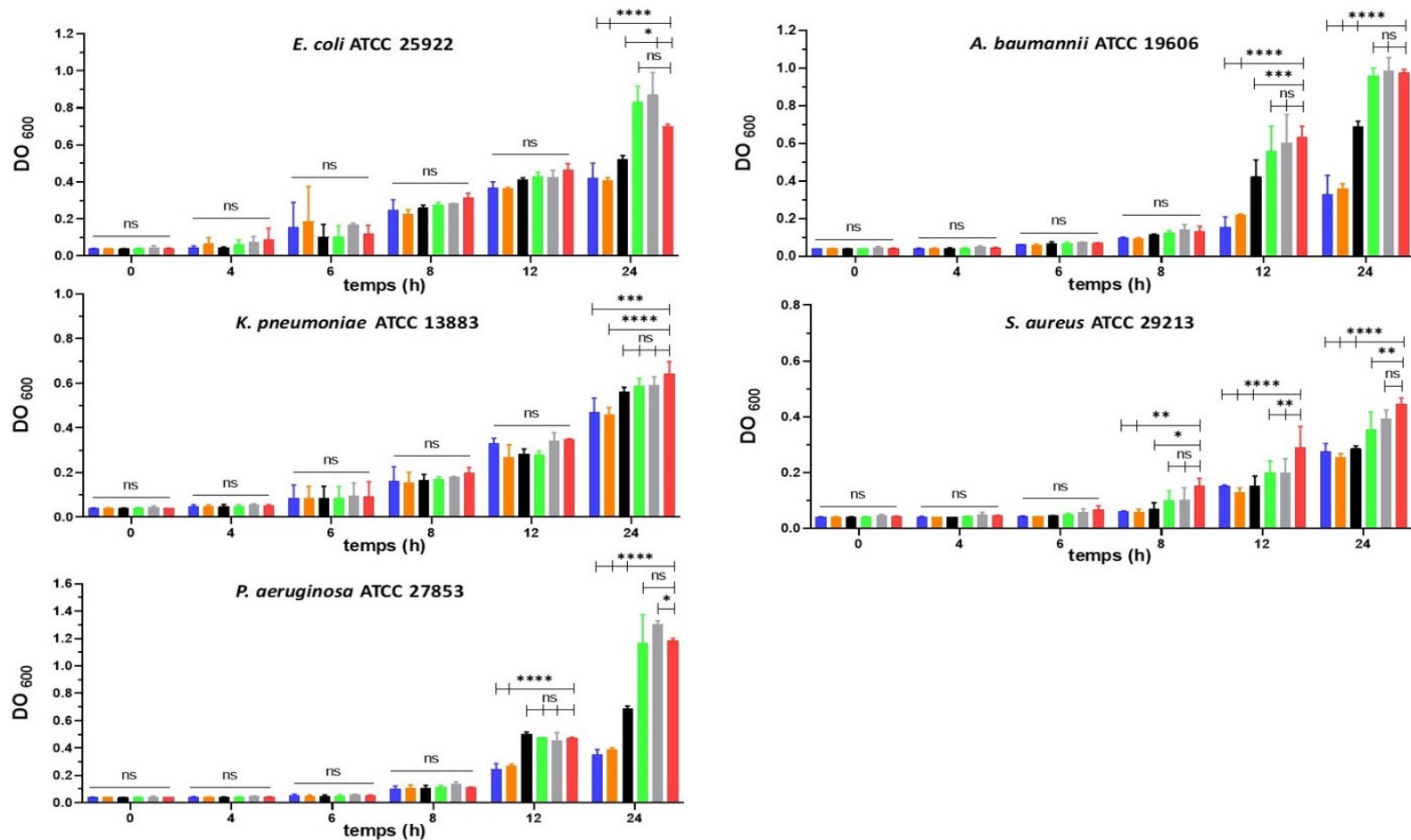


Figure 14. Influence de la concentrations de Fe^{3+} ($\mu\text{g/mL}$) sur la croissance bactérienne. Les espèces: *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *A. baumannii* ATCC 19606 et *S. aureus* ont été testées dans MHBCA-DF (—), supplémenté à 0,01 $\mu\text{g/mL}$ (—), à 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (—), à 1 $\mu\text{g/mL}$ (—), à 10 $\mu\text{g/mL}$ (—) et MHBCA (—). Chaque colonne est une moyenne avec son écart type. La significativité était mesurée par un *two-way* anova en comparaison multiple avec le MHBCA contrôle non déplété où * ; $p < 0,05$, ** ; $p < 0,01$, ***; $p < 0,001$, ****; $p < 0,0001$ et ns; non-significatif.

le MHBCA pour *E. coli* et *P. aeruginosa*. Pour toutes les espèces, une concentration de 0,1 µg/mL de Fe³⁺ représentait un intermédiaire entre MHBCA-DF et MHBCA. À 0,01 µg/mL, le même profil de croissance est obtenu que celui du MHBCA-DF comparativement au MHBCA.

3.2.2 Le profil d'inhibition des espèces bactériennes

Les profils d'inhibition rapportent les différentes concentrations minimales inhibitrices des différents antibiotiques seuls ou conjugués en milieu MHBCA ou MHBCA-DF contre les différentes espèces bactériennes. Ces tests visent à évaluer quelles combinaisons de sidérophore et de β-lactamines permettent d'avoir de l'activité contre des souches cliniques contrôles. C'est aussi un moyen de voir quelles combinaisons seront complètement inactives et donc que l'antibiotique ne sera pas valorisé. La figure 15 présente tous les profils pour chacun des conjugués SID-βL. De manière générale, les CMI's mesurées en milieu MHBCA comparativement au MHBCA-DF étaient inchangées pour les antibiotiques seuls, alors que les antibiotiques conjugués étaient plus actifs en MHBCA-DF démontrant leur dépendance à la concentration de fer. Contre *S. aureus*, la seule bactérie à Gram+, les conjugués perdent de leur activité ou du moins ne surpassent pas l'activité de l'antibiotique seul. *A. baumannii* est la seule bactérie dont tous les conjugués SID-βL ont présenté un gain d'activité par rapport à l'antibiotique seul et ce gain soit amplifié dans un milieu déprivé en fer. *E. coli* présente aussi une sensibilité à la majorité des SID-βL, mis à part le mixte-céfaclor dont l'activité bactéricide est limitée à celle de l'antibiotique seul.

3.2.2.1 Ampicilline vs. Bis-catéchol-ampicilline

L'ampicilline, la seule pénicilline, n'a pas d'activité contre trois des cinq espèces testées et n'est pas affectée par la déplétion en fer. Le bis-catéchol-ampicilline présente un tout autre profil d'inhibition. Contre *E. coli*, l'ampicilline présente une CMI de 13 µM, alors que le conjugué inhibe à une concentration de 0,05 µM en milieu déprivé en fer. Contre les souches résistantes

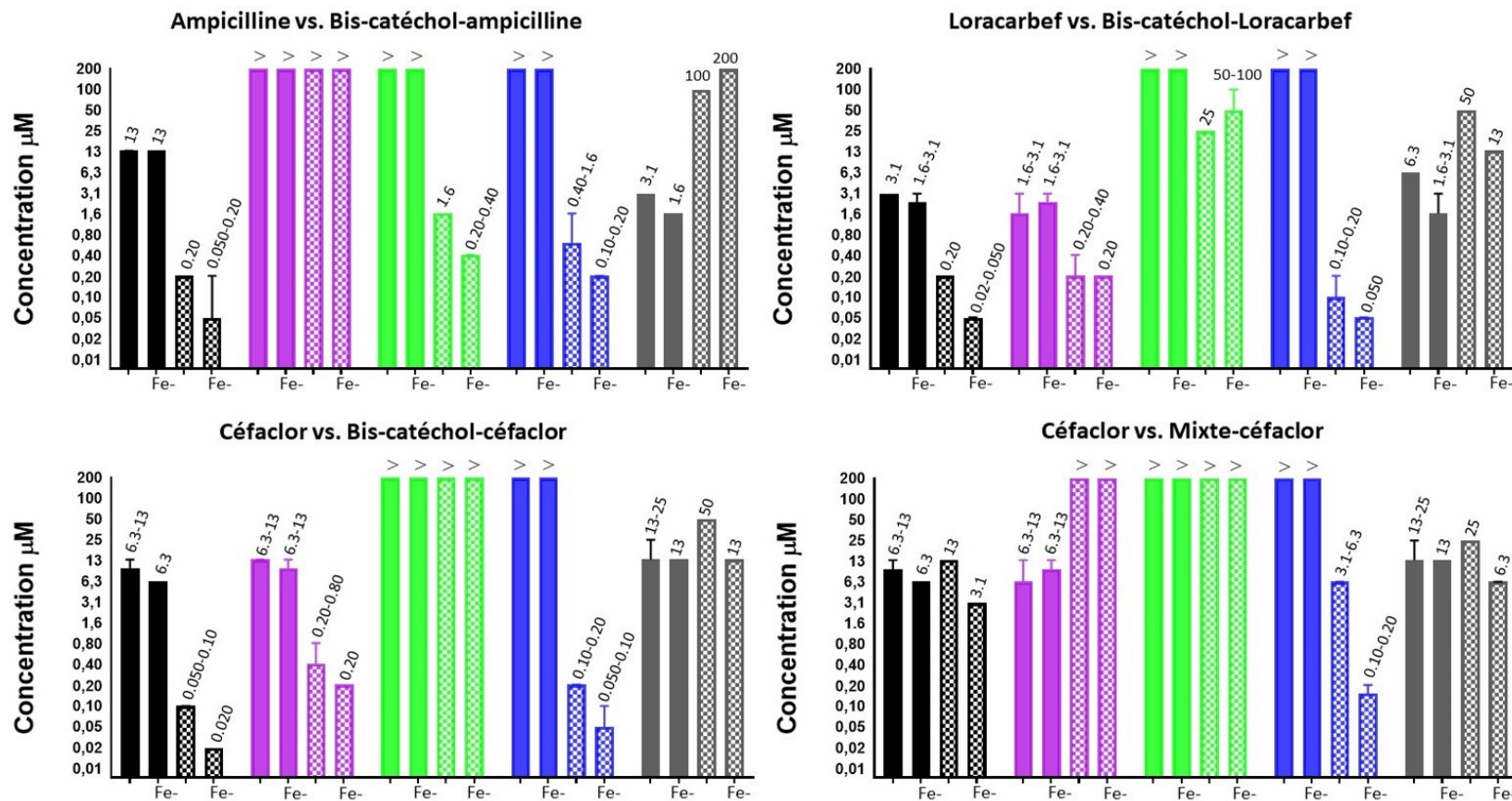


Figure 15. Activité inhibitrice des conjugués SID-βL. Les profils d'inhibition sont les CMI exprimées en µM de l'antibiotique seul (colonnes pleines) comparativement à l'antibiotique conjugué au sidérophore (colonnes quadrillées). Les données sont représentées par la médiane. Les composés ont tous été testés en MHBCA et en MHBCA-DF (Fe-) pour toutes les espèces : *E. coli* ATCC 25922 (—), *K. pneumoniae* ATCC 13883 (—), *P. aeruginosa* ATCC 27852 (—), *A. baumannii* ATCC 19606 (—) et *S. aureus* ATCC 29213 (—). Les valeurs des CMIS sont inscrites dans le haut des colonnes, alors qu'une CMI supérieure à 200 µM est représentée par un signe (>).

de *P. aeruginosa* et *A. baumannii*, les CMI sont respectivement de 0,20-0,40 et 0,10-0,20 μM en MHBCA-DF, alors que l'ampicilline seule est complètement inactive ($>200 \mu\text{M}$). C'est d'ailleurs le seul conjugué pour lequel *P. aeruginosa* est susceptible. *K. pneumoniae* reste résistant à une concentration aussi grande que 200 μM . *S. aureus* devient résistants au conjugué complètement inactif contre cette espèce, alors qu'il était sensible à l'ampicilline seule.

3.2.2.2 Loracarbef/céfaclor vs. Bis-catéchol-loracarbef/céfaclor

Le bis-catéchol-loracarbef et le bis-catéchol-céfaclor sont très semblables structurellement. Il est donc intéressant de montrer que leur profil d'inhibition, bien que très similaire, présente quelques petites différences notables. L'activité du loracarbef, une céphalosporine de 2^e génération, n'est pas affectée dans le milieu déprivé en fer pour les bactéries à Gram-, mais présente une baisse de CMI contre *S. aureus* où la CMI passe de 6,3 à 1,6-6,3 μM . Cet effet doit être considéré pour l'évaluation du conjugué. Cet effet n'est pas observé avec le céfalcon seul. Ensuite, comparativement au conjugué avec ampicilline, ceux conjuguant une céphalosporine (loracarbef ou céfalcon) sont actifs contre *K. pneumoniae*, mais leur effet est peu amplifié dans un milieu déprivé en fer. Une différence entre les deux bis-catéchol-céphalosporine peut être remarquée avec *P. aeruginosa*. En conjuguant le SID au loracarbef, on obtient des CMI mesurables de 25 μM (MHBCA) et 50-100 μM (MHCA-DF) ce qui est supérieur au $>200 \mu\text{M}$ mesuré avec le bis-catéchol-céfalcon structurellement très semblable. Finalement, ce sont les deux conjugués bis-catéchol-céphalosporine qui démontrent les plus basses CMI contre *A. baumannii* et *E. coli* (les CMI sont toutes entre 0,02 et 0,1 μM en MHBCA-DF), alors que contre ces espèces le céfalcon et le loracarbef seules ne descendent pas sous 1,6 μM .

3.2.2.3 Céfalcon vs. mixte-céfalcon

Le conjugué (mixte)bis-catéchol-mono-hydroxamate-céfalcon présente un tout autre profil d'inhibition que les trois autres conjugués. D'abord, contre *E. coli*, son activité inhibitrice ne surpasse pas celui de l'antibiotique non conjugué ou très légèrement en milieu DF (3,1

comparativement à 6,3 μM). Ensuite, bien que le céfador soit actif à 6,3 μM contre *K. pneumoniae*, la bactérie devient complètement résistante lorsque le céfador est conjugué au SID Mixte ($>200 \mu\text{M}$). Ensuite, tout comme le bis-catéchol-céfador, le mixte-céfador est toujours inactif contre *P. aeruginosa*. Ce n'est pas le cas pour *A. baumannii* dont le SID mixte est une imitation de la fimsbactine, un sidérophore qu'il synthétise et métabolise naturellement. L'assimilation du conjugué est améliorée grandement dans un milieu DF. En fait, le conjugué en MHBCA atteint une CMI de 3,1-6,3 μM , alors que dans un milieu DF elle descend à 0,10-0,20 μM . C'est contre *A. baumannii* que le conjugué mixte-céfador est le plus actif parmi les espèces testées. L'activité obtenue contre *S. aureus* est équivalente au céfador seul.

CHAPITRE 4

DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

4.1 L'activité inhibitrice de SPR859

Les résultats décrits dans ce mémoire appuient le développement de nouvelles β -lactamines optimisée, soit une première carbapénème pouvant être administrée oralement pour le traitement d'infection urinaire compliquée, ainsi que des β -lactamines conjuguées à un sidérophore pour leur revalorisation. D'abord, il a été démontré que la carbapénème orale (le TBPM-PI-HBr étant la prodrogue et le tébipénème la forme active), démontre une accumulation dans l'urine supérieure à toutes les autres carbapénèmes (Eckburg et al., 2019; Hotomi et al., 2007 ; Kato et al., 2010). Ceci en fait une drogue de choix pour le traitement des infections urinaires du tractus urinaire supérieur et causées par des microorganismes résistants aux fluoroquinolones et produisant des ESBLs (Rubio et al., 2018). Cette résistance est surtout retrouvée avec des bactéries comme *E. coli* et *K. pneumoniae*, deux microorganismes très prévalents dans ce type d'infection. Or, le tébipénème-pivoxil, bien que commercialisé au Japon ne rencontrait pas les tests nécessaires pour son approbation pour son usage clinique en Amérique (Jain et al., 2018). Cette étude palliait le manque de preuves de son mécanisme antibactérien, soit la liaison au site actif des PBPs. D'une façon générale, les carbapénèmes sont connues pour lier avec une meilleure affinité les PBPs essentielles de haut poids moléculaire. De plus, elles démontrent un spectre d'hôte très large tout en restant résistantes à la plupart des classes de β -lactamases (voir figure 7) (Zhanel et al., 2007). Dans l'étude présentée au chapitre 2, les concentrations minimales inhibitrices montraient une efficacité très semblable au comparateur (le méropénème) contre tous les microorganismes testés. Par contre, l'activité contre le SARM n'était pas cliniquement valable la CMI étant trop haute (8-16 $\mu\text{g/mL}$ pour SPR859). Le tébipénème était moins efficace que le méropénème pour inhiber la croissance de *P. aeruginosa* comme il avait déjà été observé (Jain et al., 2018). Pour les mesures d'IC₅₀, un contrôle sans BoFL s'est avéré être absolument nécessaire pour reconnaître les bandes de protéines autofluorescentes n'étant pas des PBPs (voir

figure S2 du matériel supplémentaire). D'ailleurs, ces bandes ont été séquencées chez *P. aeruginosa*, *E. coli* et *S. aureus*. Puisqu'elles étaient visibles aux UVs, il a été possible de les extraire des gels et faire la digestion à la trypsine directement. Les échantillons ont été analysés en spectrométrie de masse à la plateforme de protéomique de l'Université de Sherbrooke. À la suite de l'analyse, il a été possible de déterminer qu'il s'agissait de flavoprotéines de la chaîne respiratoire, qui agissent comme succinate déshydrogénase et fumarate réductase, liée par un lien covalent au cofacteur fluorescent FAD (la flavine adénine dinucléotide) (Starbid et al., 2017).

Suite aux analyses d'IC₅₀, il a été possible de confirmer que chez *E. coli* et *K. pneumoniae*, le tébipénème inhibe la croissance en liant les PBPs de haut poids moléculaire avec une plus grande affinité pour la PBP2, suivi de la PBP3 et finalement les PBP1a et 1b. Le phénotype d'élargissement des cellules confirmait l'inhibition de la PBP2 comme mécanisme bactéricide principale. Cependant, contre *P. aeruginosa*, le méropénème et le tébipénème démontraient une affinité très semblable dans leur liaison avec les PBP2 et PBP3 comme il a déjà été possible d'observer avec d'autres carbapénèmes (Davies et al., 2008 ; Horii et al., 1998). D'ailleurs, le phénotype observé au microscope démontre l'inhibition double de ces deux PBPs. En fait, bien que la PBP2 soit une cible chez *P. aeruginosa*, c'est l'inhibition de la PBP3 qui est la plus importante puisque c'est la seule transpeptidase qui ait été démontrée essentielle chez cette espèce (Chen et al., 2017). Ceci peut être confirmé avec la réaction de *P. aeruginosa* à l'amdinocilline (mécillinam) qui cible uniquement la PBP2. Une concentration très haute de cet antibiotique est nécessaire pour inhiber *P. aeruginosa* (256 µg/mL). Cependant, une forme arrondie est tout de même observée et une IC₅₀ très basse pour la PBP2 est mesurée (0,34 µg/mL). Dans l'article au chapitre 2, on souligne l'implication de différents mécanismes de résistance pour expliquer cette différence entre la CMI et l'IC₅₀. Mis à part ces mécanismes, une explication pourrait se trouver dans le phénotype observé au microscope. Celui-ci présente des cellules de forme arrondie, mais non élargie comme *E. coli*. Cela démontre que l'organisation du peptidoglycane et que la machinerie d'assemblage diffère entre les deux espèces et que, dans le cas de *P. aeruginosa*, la PBP2 perd son caractère essentiel. C'est une hypothèse détaillée par

Legaree *et al.* (2007) qui démontre que malgré des PBPs de même classe (B2 pour les PBP2 et B3 pour les PBP3) *P. aeruginosa* manquant une PBP2 est toujours viable (Legaree et al., 2007). Cet élément souligne le fait que malgré la redondance dans les fonctions transpeptidase des PBPs à haut poids moléculaire, certaines PBPs évoluent pour occuper une fonction essentielle et ce caractère diffère selon l'espèce (Goffin and Ghuysen, 1998). En fait, l'essentialité n'est pas la seule raison qui explique une résistance. Pour *K. pneumoniae*, la liaison de la PBP2 est suffisante puisque le tébipénème a une affinité très grande contre celle-ci comparativement aux autres PBPs et cela corrèle avec une CMI très basse. Cependant, l'amdinocilline qui ne vise que la PBP2 n'est pas suffisante malgré une IC₅₀ de 0,055 µg/mL. Or, bien que les mécanismes précis de résistance contre cet antibiotique soient très peu connus, ceux-ci seraient liés à la réponse au stress (Lai et al., 2017). Finalement, un tout autre portrait se dresse avec *S. aureus*. D'abord pour étudier l'entièreté de ses PBPs, l'ajout de l'avibactam était nécessaire dû au fait que sa PBP4 ait une fonction β-lactamase-transpeptidase-carboxypeptidase. L'avibactam comme montré dans le tableau 1, est un inhibiteur à large spectre capable de lier le domaine β-lactamase de cette PBP et prévenir l'hydrolyse de la bocilline FL. Or, puisque cette PBP possède deux domaines (transpeptidase-β-lactamase et carboxypeptidase) composés d'une sérine au site actif l'avibactam peut inhiber la fonction β-lactamase permettant à la bocilline de lier la PBP sans être hydrolysée (Navratna et al., 2010; Asli et al., 2016). Ensuite, pour *S. aureus*, le tébipénème avait une meilleure affinité pour la PBP1 qui pour *S. aureus* ne possède que la fonction transpeptidase. C'est la PBP2 de *S. aureus* qui est de classe A (possède le domaine transpeptidase et transglycosylase) (Terrak et al., 2008). L'essentialité des PBPs de cette espèce est moins définie. Il semblerait qu'une inhibition seule de la PBP1 engendre un important défaut de croissance, mais une inhibition double de la PBP2 et/ou PBP3 soit nécessaire (Pereira et al., 2007). Contre la MRSA, la PBP2a palliait l'inhibition des autres fonctions transpeptidases, or l'inhibition se voyait à de bien plus hautes concentrations d'antibiotique.

4.2. L'activité inhibitrice des conjugués sidérophore- β -lactamine

Nos résultats ont montré que la conjugaison d'une β -lactamine à un sidérophore était une stratégie de valorisation très efficace. Pour observer ce phénomène de valorisation, il était nécessaire de reproduire les conditions pauvres en fer d'une infection à l'aide du chelex®, une résine chélatrice d'ions multivalents. D'ailleurs, cette résine n'est pas sélective seulement au Fe^{3+} . C'est pourquoi la supplémentation des autres ions essentiels est nécessaire. La résine chélate les ions multivalents dans cet ordre dans les conditions testées : $\text{Fe}^{3+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ (Bio-Rad laboratories, 2000). L'ajustement des ions de calcium, magnésium et zinc se faisait selon les analyses de concentration d'ions initiale dans les milieux (Huband et al., 2017 ; Hackel et al., 2019). Dans la littérature, plusieurs laboratoires ont dosé le fer à la suite de la déplétion et ont démontré la déplétion du Fe^{3+} engendrait une concentration inférieure à $0,03 \mu\text{g/mL}$ (Ito et al., 2016; Hackel et al., 2019). Ces mêmes laboratoires ont aussi mesuré la concentration en Fe^{3+} de différents milieux MHBCA provenant de plusieurs compagnies avant la déplétion. Ces concentrations se situaient toutes entre $0,18$ et $0,4 \mu\text{g/mL}$ de Fe^{3+} (Huband et al., 2017 et Hackel et al., 2019). Considérant cela, l'addition de $0,1$ ou $1 \mu\text{g/mL}$ devrait permettre de rétablir la croissance du milieu déplété et c'est effectivement ce qui a été observé. Ainsi, $0,01 \mu\text{g/mL}$ ne présentait pas de différence de croissance avec le milieu déprivé en fer et présentait une DO_{600} à 24 h significativement inférieur comparativement au contrôle MHBCA. Considérant que les ions Fe^{3+} restants à la suite de la déplétion sont négligeables, une concentration de $0,01 \mu\text{g/mL}$ correspond à $1,8 \times 10^{-7} \text{ M}$ de Fe^{3+} . Considérant que l'intervalle de croissance optimale se situe entre 10^{-5} et 10^{-7} M de Fe^{3+} (Andrews et al., 2003), la concentration de $0,01 \mu\text{g/mL}$ est dans la limite inférieure et est représentatif du milieu MHBCA-DF. Ainsi l'utilisation du MHBCA-DF sera optimale, puisqu'il permet une croissance assez soutenue pour observer l'effet des β -lactamines tout en ayant le fer comme caractère limitant. Enfin, toutes les espèces bactériennes présentent une densité optique (DO) inférieure à 24 h ce qui est représentatif d'une rareté en fer du milieu comme il avait déjà été rapporté (Domingue et al., 1990, Kadurugamuwa et al., 1987). Finalement, $10 \mu\text{g/mL}$ permettait parfois une croissance supérieure pour *P. aeruginosa* et *E. coli* comparativement au MHBCA non déplété démontrant

que ce milieu n'est pas optimal pour toutes les espèces, mais permettra de marquer la différence d'expression des transporteurs de fer.

Le profil d'inhibition des différents conjugués SID- β L a été obtenu par les mesures des CMI₅₀ en milieu MHBCA-DF ou MHBCA et en comparant l'activité inhibitrice des β -lactamines seules et une fois conjuguées. D'abord, les β -lactamines seules n'étaient pas affectées par la déplétion en fer. Ceci démontre leur indépendance à la concentration de l'ion pour pénétrer la membrane externe des bactéries à Gram-. En fait, les β -lactamines pénètrent la membrane externe par les porines et par diffusion. Les propriétés de la molécule ; leur charge intrinsèque et leur grosseur sont les facteurs principaux de leur capacité à pénétrer la membrane (Zimmermann, Rosselet, 1977; Nikaido et al., 1983). Un milieu pauvre en fer peut déclencher la réponse au stress et modifier la surface externe bactérienne (Choi and Lee, 2019). Cependant, les porines impliquées ne semblent pas affectées par cette réponse puisque l'action des antibiotiques seuls est inchangée. Or, la concentration externe de fer affecte l'activité des conjugués SID- β Ls. En fait, les conjugués sont trop gros (>700 Da) pour la limite d'exclusion (<600 Da) des porines bactériennes (Nikaido and Vaara, 1985). Leur mode d'entrée sera donc les transporteurs de sidérophores. L'expression de ces transporteurs est dépendante de Fur et de la quantité d'ions Fe^{2+} . Cette dernière découle de la concentration externe de fer sous forme Fe^{3+} . Fur- Fe^{2+} est activé pour réprimer l'expression des gènes impliqués dans l'acquisition du fer pour éviter un trop grand apport de fer qui pourrait mettre en danger la vie de la cellule due aux EROs (Woodmansee and Imlay, 2002). Dans un milieu pauvre en fer, Fur est inactif et permet l'expression des gènes impliqués dans l'acquisition du fer. Ici, on estime que sous 5-10 μM de fer externe, Fur est enclenché ; ce qui équivaut à une concentration d'environ 0,3 à 0,6 $\mu\text{g/mL}$ (Andrews et al., 2003). La concentration en fer du milieu MHBCA se situe dans cet intervalle ce qui en fait un milieu qui activera l'expression des transporteurs de fer. Ceci explique pourquoi une très bonne activité est déjà observée pour la majorité des conjugués actifs. L'expression des transporteurs est déjà active et le fait de plonger les bactéries dans un milieu encore plus limité en fer augmente l'expression de transporteurs ce qui diminue encore plus les CMI₅₀ des conjugués actifs.

L'import des conjugués menant à l'activité inhibitrice est différent pour chaque espèce menant à différents profils d'inhibition. *E. coli* était inhibé par tous les conjugués et cette inhibition était augmentée dans un milieu MHBCA-DF. Un meilleur import dû à une plus grande expression des récepteurs reconnaissant les parties sidérophores pourrait expliquer cette différence (Diarra et al., 1996). Le conjugué mixte-céfaclor n'est pas plus actif que le céfaclor seul probablement dû au fait que sa forme n'est pas liée par les transporteurs d'*E. coli* ou bien que le sidérophore interfère dans la liaison avec les PBPs. *K. pneumoniae*, bien que rapproché phylogénétiquement d'*E. coli* présente une susceptibilité autre. D'abord, cette espèce est intrinsèquement résistante aux pénicillines comme l'ampicilline dû à l'expression de SHV-1 une pénicillinase (Haegmann et al., 2004). Or, les mécanismes de résistance contre l'antibiotique seuls ne sont pas nécessairement ceux agissant contre les conjugués. Ainsi, la conjugaison à un sidérophore ne semble pas rendre l'ampicilline active soit parce qu'elle est toujours hydrolysée, ou parce qu'elle ne pénètre pas la membrane externe. Ensuite, comme pour *E. coli* le mixte-céfaclor n'est pas plus actif que le céfaclor seul. Ceci est probablement dû à un manque de pénétration ou à une interférence avec la liaison aux PBPs. Cependant, les β -lactamases ne semblent pas en cause puisque le céfaclor et le bis-catéchol céfaclor sont actifs. *P. aeruginosa* était résistant à tous les antibiotiques testés. Cette espèce possède une céphalosporinase AmpC ce qui pourrait expliquer la résistance au céfaclor et au loracarbef (Quale et al., 2006). La résistance intrinsèque à l'ampicilline par *P. aeruginosa* s'explique par l'addition de plusieurs facteurs, dont l'imperméabilité de la membrane et son exclusion, mais surtout par l'expression de β -lactamases (Livermore 1995). Or, le problème d'exclusion serait surpassé par le sidérophore qui pénètre par les transporteurs spécifiques du sidérophore et une sensibilité réduite aux β -lactamases a déjà été documentée pour le cefidérol, un autre conjugué SID- β L (Ito et al., 2018). En fait, le mécanisme n'est pas encore bien compris, mais le cefidérol n'induit pas l'expression des β -lactamases. Il se pourrait que le même mécanisme soit en cause ici. Pour ce qui est du mixte-céfaclor, encore une fois il n'est pas possible pour le moment de dire si la résistance est due à AmpC, à une interférence avec la liaison aux PBPs ou bien parce que les transporteurs ne reconnaissent pas le sidérophore. Ceci n'est pas le cas pour *A. baumannii* contre qui le mixte-céfaclor est très efficace. La structure de ce sidérophore est reconnue par les transporteurs d'*A. baumannii*, car sa structure est une imitation de la fimsbactine naturellement produite par le

genre *Acinetobacter spp.* (Ghosh et al., 2017 ; Proschak et al., 2013) De plus, cette espèce est résistante à toutes les β -lactamines testées non conjuguées, mais sensible à tous les SID- β Ls. *A. baumannii* est une espèce naturellement compétente et ayant acquis plusieurs gènes de résistance dont des β -lactamases de type AmpC hydrolysant les céphalosporines et de type OXA reconnues pour lyser l'oxacilline et les pénicillines en général (Fournier et al., 2006). Finalement, *S. aureus* est la seule bactérie à Gram⁺ de notre étude et qui ne possède donc pas de membrane externe. L'internalisation des sidérophores par les transporteurs de fer situés directement sur la membrane cytoplasmique, impliquerait donc que les conjugués (une fois internalisée) n'aient plus accès aux PBPs situées à la surface externe des cellules. La liaison à un sidérophore pourrait aussi influencer la liaison de l'antibiotique à la cible ce qui expliquerait cette perte d'activité observée pour tous les conjugués. De manière général, c'est le sidérophore qui semble influencer la spécificité pour l'espèce bactérienne à Gram⁻ visée, mais le sidérophore n'apporte aucun bénéfice pour l'espèce à Gram⁺ *S. aureus*.

4.3 Conclusion et perspectives

L'étude présentée dans la première partie de ce mémoire établit la preuve de la liaison du tébipénème aux PBPs des bactéries les plus prévalentes lors d'infections urinaires, soit *E. coli* et *K. pneumoniae*. *Pseudomonas aeruginosa* et *S. aureus* MSSA et MRSA ont aussi été testées. D'autres essais sont en cours pour son approbation future par la FDA et pour son utilisation chez l'humain afin de traiter oralement les infections urinaires causées par des microorganismes résistants aux fluoroquinolones et producteurs de ESBLs.

Les résultats du profil d'inhibition de quatre conjugués SID- β L sont préliminaires et sont les premiers tests visant à caractériser leur mode d'action contre cinq espèces bactériennes d'importance clinique. La conjugaison s'est avérée être un moyen de valorisation des antibiotiques contre les bactéries à Gram⁻ sans apporter de bénéfice contre *S. aureus*, une bactérie à Gram⁺. Le sidérophore semble être la structure qui oriente la spécificité au transporteur et donc le profil d'activité. De plus, certains résultats avec *A. baumannii* et *P.*

aeruginosa pourraient démontrer une perte de sensibilité des conjugués face à certaines β -lactamases et permettre un gain d'activité. D'autres tests devront être effectués pour démontrer cet effet. Un test de liaison aux PBPs tel qu'utilisé dans l'article présenté au chapitre 2, sera aussi une technique qui permettra de déterminer l'impact de la conjugaison du sidérophore sur la liaison aux PBPs ciblées par les β -lactamines. Enfin, même s'il y a clairement un lien entre l'activité des conjugués et le niveau de fer disponible pour la bactérie, il restera à démontrer hors de tout doute que les transporteurs du fer sont bel et bien la porte d'entrée des SID- β L chez les bactéries à Gram- susceptibles.

Finalement, l'augmentation de la prévalence des infections par des bactéries multirésistantes force la recherche de nouvelles solutions et la coopération internationale pour surmonter ce problème qui menace l'humanité. Les β -lactamines sont des antibiotiques qui ont déjà prouvé leur valeur et leur utilité. L'élargissement de leurs propriétés pharmacodynamiques est un moyen de valorisation au même titre que leur conjugaison à un sidérophore. Or, une mise en marché de conjugués SID- β L représenterait l'arrivée d'une nouvelle classe de molécules exploitant le métabolisme d'assimilation du fer bactérien. Pour la recherche fondamentale, ceci représente une occasion d'améliorer notre compréhension face au système d'assimilation de l'ion essentiel à la virulence et à la survie bactérienne.

BIBLIOGRAPHIE

Agence de la santé publique du Canada. Système canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens-Rapport de 2016, p. 114-115.

Agence de la santé publique du Canada. Système Canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens-Rapport de 2018, p159-160.

Alderson, R.G., Barker, D., and Mitchell, J.B.O. (2014). One origin for metallo- β -lactamase activity, or two? An investigation assessing a diverse set of reconstructed ancestral sequences based on a sample of phylogenetic trees. *J Mol Evol* 79, 117–129.

Ambler, R.P. (1980). The structure of β -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 289, 321–331.

Andrews, S.C., Robinson, A.K., and Rodriguez-Quinones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 215–237.

Arends, S.J.R., Rhomberg, P.R., Cotroneo, N., Rubio, A., Flamm, R.K., and Mendes, R.E. (2019). Antimicrobial activity evaluation of tebipenem (SPR859), an orally available carbapenem, against a global set of *Enterobacteriaceae* isolates, including a challenge set of organisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63, e02618-18.

Asli, A., Brouillette, E., Krause, K.M., Nichols, W.W., and Malouin, F. (2016). Distinctive binding of avibactam to penicillin-binding proteins of gram-negative and gram-positive bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 752–756.

Barreteau, H., Kovač, A., Boniface, A., Sova, M., Gobec, S., and Blanot, D. (2008). Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 168–207.

Barrett, D., Leimkuhler, C., Chen, L., Walker, D., Kahne, D., and Walker, S. (2005). Kinetic characterization of the glycosyltransferase module of *Staphylococcus aureus* PBP2. *J. Bacteriol.* 187, 2215–2217.

Berrazeg, M., Jeannot, K., Ntsogo Enguéné, V.Y., Broutin, I., Loeffert, S., Fournier, D., and Plésiat, P. (2015). Mutations in β -lactamase AmpC increase resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to antipseudomonal cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 6248–6255.

Bilitewski, U., Blodgett, J.A.V., Duhme-Klair, A.K., Dallavalle, S., Laschat, S., Routledge, A., and Schobert, R. (2017). Chemical and biological aspects of nutritional immunity—perspectives for new anti-infectives that target iron uptake systems. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 56, 14360–14382.

Bio-Rad (2000). Chelex ® 100 and Chelex 20 Chelating Ion Exchange Resin Instruction Manual. p. 3-5.

Blumberg, PM and Strominger, J. (1974). Interaction of penicillin with the bacterial cell: penicillin-binding proteins and penicillin-sensitive enzymes. *Bacteriol. Rev.* 38, 291–335.

Boucher, H.W., Talbot, G.H., Bradley, J.S., Edwards, J.E., Gilbert, D., Rice, L.B., Scheld, M., Spellberg, B., and Bartlett, J. (2009). Bad Bugs , No Drugs : No ESKAPE ! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 48, 1–12.

Braun, V. (2001). Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 67–79.

Braun, V., and Killmann, H. (1999). Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem. Sci.* 24, 104–109.

Braun, V., Pramanik, A., Gwinner, T., Köberle, M., and Bohn, E. (2009). Sideromycins: tools and antibiotics. *Biometals* 22, 3–13.

Buchanan, S.K., Smith, B.S., Venkatramani, L., Xia, D., Esser, L., Palnitkar, M., Chakraborty, R., Van Der Helm, D., and Deisenhofer, J. (1999). Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* 6, 56–63.

Bush, K., Jacoby, G.A., and Medeiros, A.A. (1995). A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1211–1233.

Bush, K. (1998). Metallo-beta-lactamases: A class apart. *Clin. Infect. Dis.* 27, 48–53.

Bush, K. (2013). The ABCD's of β -lactamase nomenclature. *J. Infect. Chemother.* 19, 549–559.

Bush, K. (2018). Past and present perspectives on β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62, 1–20.

Bush, K., and Bradford, P.A. (2016). β -Lactams and β -Lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, a025247.

Bush, K., and Bradford, P.A. (2019). Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 295–306.

Bush, L.M., and Johnson, C.C. (2000). Ureidopenicillins and β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 14, 409–433.

Centers for disease control and prevention (CDC). Diseases and Organisms in Healthcare Settings (7 octobre 2019) [en ligne]. <https://www.cdc.gov/hai/organisms/organisms.html>.

Chain, E., Florey, H.W., Gardner, A.D., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Orr-Ewing, J., and Sanders, A.G. (1940). Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet* 236, 226–228.

Chen, W., Zhang, Y., and Davies, C. (2017). Penicillin-binding protein 3 is essential for growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 61, e01651-16.

Choi, U., and Lee, C.-R. (2019). Distinct roles of outer membrane porins in antibiotic resistance and membrane integrity in *Escherichia coli*. *Front. Microbiol* 10, 953.

CLSI. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute;2018.

Conroy, B.S., Grigg, J.C., Kolesnikov, M., Morales, L.D., and Murphy, M.E.P. (2019). *Staphylococcus aureus* heme and siderophore-iron acquisition pathways. *BioMetals* 32, 409–424.

Conseil des académies canadiennes, 2019. Quand les antibiotiques échouent. Ottawa (ON): Comité d’experts sur les incidences socioéconomiques potentielles de la résistance aux antimicrobiens au Canada.

Coy, M., and Neilands, J.B. (1991). Structural dynamics and functional domains of the Fur protein. *Biochemistry* 30, 8201–8210.

Curtis, N.A.C., Eisenstadt, R.L., East, S.J., Cornford, R.J., Walker, L.A., and White, A.J. (1988). Iron-regulated outer membrane proteins of *Escherichia coli* K-12 and mechanism of action of catechol-substituted cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 1879–1886.

Dale, J.W., Godwin, D., Mossakowska, D., Stephenson, P., and Wall, S. (1985). Sequence of the OXA2 β -lactamase: comparison with other penicillin-reactive enzymes. *FEBS Lett.* 191, 39–44.

Davies, T.A., Shang, W., Bush, K., and Flamm, R.K. (2008). Affinity of doripenem and comparators to penicillin-binding proteins in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 1510–1512.

Demain, A.L., and Elander, R.P. (1999). The β -lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie Van Leeuwenhoek* 75, 5–19.

Demain, A.L., and Zhang, J. (1998). Cephalosporin C production by *Cephalosporium acremonium*: the methionine story. *Crit. Rev. Biotechnol.* 18, 283–294.

Diarra, M.S., Lavoie, M.C., Jacques, M., Darwish, I., Dolence, E.K., Dolence, J.A., Ghosh, A., Ghosh, M., Miller, M.J., and Malouin, F. (1996). Species selectivity of new siderophore-drug conjugates that use specific iron uptake for entry into bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 2610–2617.

Domingue, P.A.G., Mottle, B., Morck, D.W., Brown, M.R.W., and Costerton, J.W. (1990). A simplified rapid method for the removal of iron and other cations from complex media. *J. Microbiol. Methods* 12, 13–22.

Drawz, S., and Bonomo, R. (2010). Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 160–201.

Durand-Réville, T.F., Guler, S., Comita-Prevoir, J., Chen, B., Bifulco, N., Huynh, H., Lahiri, S., Shapiro, A.B., McLeod, S.M., Carter, N.M., *et al.* (2017). ETX2514 is a broad-spectrum β -lactamase inhibitor for the treatment of drug-resistant Gram-negative bacteria including *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Microbiol* 2, 17104.

Durand, G.A., Raoult, D., and Dubourg, G. (2019). Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *Int. J. Antimicrob. Agents* 53, 371–382.

Eckburg, P.B., Jain, A., Walpole, S., Moore, G., Utley, L., Manyak, E., Dane, A., and Melnick, D. (2019). Safety, pharmacokinetics, and food effect of tebipenem pivoxil hydrobromide after single and multiple ascending oral doses in healthy adult subjects. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63, e00618-19.

Edwards, S.J., Emmas, C.E., and Campbell, H.E. (2005). Systematic review comparing meropenem with imipenem plus cilastatin in the treatment of severe infections. *Curr. Med. Res. Opin.* 21, 785–794.

Ehmann, D.E., Jahic, H., Ross, P.L., Gu, R.-F., Hu, J., Kern, G., Walkup, G.K., and Fisher, S.L. (2012). Avibactam is a covalent, reversible, non- β -lactam β -lactamase inhibitor. *PNAS* 109, 11663–11668.

Ehmann, D.E., Jahić, H., Ross, P.L., Gu, R.F., Hu, J., Durand-Réville, T.F., Lahiri, S., Thresher, J., Livchak, S., Gao, N., *et al.* (2013). Kinetics of avibactam inhibition against class A, C, and D β -lactamases. *J. Biol. Chem.* 288, 27960–27971.

Emeraud, C., Escaut, L., Boucly, A., Fortineau, N., Bonnin, R.A., Naas, T., and Dortet, L. (2019). Aztreonam plus clavulanate, tazobactam, or avibactam for treatment of infections caused by metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63, e00010-19.

Everett, M., Sprynski, N., Coelho, A., Castandet, J., Bayet, M., Bougnon, J., Lozano, C., Davies, D.T., Leiris, S., Zalacain, M., *et al.* (2018). Discovery of a novel metallo- β -lactamase inhibitor that potentiates meropenem activity against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62, e0074-18.

Ferguson, A.D., Braun, V., Fiedler, H.-P., Coulton, J.W., Diederichs, K., and Welte, W. (2000). Crystal structure of the antibiotic albomycin in complex with the outer membrane transporter FhuA. *Protein Sci.* 9, 956–963.

- Fisher, J.F., and Mobashery, S. (2016). β -lactam resistance mechanisms: Gram-positive bacteria and *Mycobacterium tuberculosis*. Cold Spring Harb Perspect Med 6, a025221.
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. Br J Exp Pathol 10, 226–236.
- Fournier, D., Richardot, C., Müller, E., Robert-Nicoud, M., Llanes, C., Plésiat, P., and Jeannot, K. (2013). Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother. 68, 1772–1780.
- Fournier, P.-E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poiriel, L., Richet, H., Robert, C., Mangenot, S., Abergel, C., *et al.* (2006). Comparative Genomics of Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii*. Plos Genet. 2, 62–72.
- Franz, K.J. (2013). Clawing back: broadening the notion of metal chelators in medicine. Curr. Opin. Chem. Biol. 17, 143–149.
- Frère, J.-M., Duez, C., and Ghuysen, J.-M. (1976). Occurrence of a serine residue in the penicillin-binding site of the exocellular DD-carboxy-peptidase-transpeptidase from *Streptomyces* R61. FEBS Lett. 70, 257–260.
- Frère, J.M., Nguyen-Distèche, M., Coyette, J., and Joris, B. (1992). Mode of action: interaction with the penicillin binding proteins. In The Chemistry of β -Lactams, (Springer Netherlands), pp. 148–197.
- Ghosh, A., Ghosh, M., Niu, C., Malouin, F., Moellmann, U., and Miller, M.J. (1996). Iron transport-mediated drug delivery using mixed-ligand siderophore-beta-lactam conjugates. Chem. Biol. 3, 1011–1019.
- Ghosh, M., Miller, P.A., Möllmann, U., Claypool, W.D., Schroeder, V.A., Wolter, W.R., Suckow, M., Yu, H., Li, S., Huang, W., *et al.* (2017). Targeted antibiotic delivery: selective siderophore conjugation with daptomycin confers potent activity against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* both *in vitro* and *in vivo*. J. Med. Chem. 60, 4577–4583.
- Ghuysen, J.-M. (1968). Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. Bacteriol. Rev. 32, 425–464.
- Ghuysen, J.-M. (1991). Serine β -lactamases and penicillin-binding proteins. Annu. Rev. Microbiol. 45, 37–67.
- Ghuysen, J.-M., Frere, J.-M., Leyh-Bouille, M., Nguyen-Distèche, M., and Coyette, J. (1986). Active-site-serine D-alanyl-D-alanine-cleaving-peptidase-catalysed acyl-transfer reactions. Biochem. J 235, 159–165.
- Giacobbe, D.R., De Rosa, F.G., Del Bono, V., Grossi, P.A., Pea, F., Petrosillo, N., Rossolini, G.M., Tascini, C., Tumbarello, M., Viale, P., *et al.* (2019). Ceftobiprole: drug evaluation and

place in therapy. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 17, 689–698.

Goffin, C., and Ghuysen, J.-M. (1998). Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1079–1093.

Hackel, M.A., Tsuji, M., Yamano, Y., Echols, R., Karlowsky, J.A., and Sahm, D.F. (2019). Reproducibility of broth microdilution MICs for the novel siderophore cephalosporin, cefiderocol, determined using iron-depleted cation-adjusted Mueller-Hinton broth. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 94, 321–325.

Hæggman, S., Löfdahl, S., Paauw, A., Verhoef, J., and Brisse, S. (2004). Diversity and evolution of the class A chromosomal β -lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2400–2408.

Harrison, C.J., and Bratcher, D. (2008). Cephalosporins: A Review. *Pediatr. Rev.* 29, 264–273.

Hazra, S., Xu, H., and Blanchard, J.S. (2014). Tebipenem, a new carbapenem antibiotic, is a slow substrate that inhibits the β -lactamase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 53, 3671–3678.

Hider, R.C., and Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* 27, 637–657.

Higgs, P.I., Myers, P.S., and Postle, K. (1998). Interactions in the TonB-dependent energy transduction complex: ExbB and ExbD form homomultimers. *J. Bacteriol.* 180, 6031–6038.

Horii, T., Kobayashi, M., Sato, K., Ichiyama, S., and Ohta, M. (1998). An *in vitro* study of carbapenem-induced morphological changes and endotoxin release in clinical isolates of Gram-negative bacilli. *J. Antimicrob. Chemother.* 41, 435–442.

Hotomi, M., Suzumoto, M., Itahashi, K., Nagura, J., Fukushima, T., Shimada, J., Billal, D.S., Yamauchi, K., Fujihara, K., and Yamanaka, N. (2007). Efficacy of a novel oral carbapenem, tebipenem pivoxil (TBM-PI), against experimental otitis media caused by penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* in chinchilla. *Vaccine* 25, 2478–2484.

Houbraken, J., Frisvad, J.C., and Samson, R.A. (2011). Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA Fungus* 2, 87–95.

Huband, M.D., Ito, A., Tsuji, M., Sader, H.S., Fedler, K.A., and Flamm, R.K. (2017). Cefiderocol MIC quality control ranges in iron-depleted cation-adjusted Mueller–Hinton broth using a CLSI M23-A4 multi-laboratory study design. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 88, 198–200.

Hujer, A.M., Kania, M., Gerken, T., Anderson, V.E., Buynak, J.D., Ge, X., Caspers, P., Page, M.G.P., Rice, L.B., and Bonomo, R.A. (2005). Structure-activity relationships of different β -lactam antibiotics against a soluble form of *Enterococcus faecium* PBP5, a Type II bacterial

transpeptidase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 612–618.

Huovinen, P., Huovinen, S., and Jacoby, G.A. (1988). Sequence of PSE-2 β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 134–136.

Ito, A., Nishikawa, T., Matsumoto, S., Yoshizawa, H., Sato, T., Nakamura, R., Tsuji, M., and Yamano, Y. (2016). Siderophore cephalosporin cefiderocol utilizes ferric iron transporter systems for antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 7396–7401.

Ito, A., Nishikawa, T., Ota, M., Ito-Horiyama, T., Ishibashi, N., Sato, T., Tsuji, M., and Yamano, Y. (2018). Stability and low induction propensity of cefiderocol against chromosomal AmpC β -lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother* 73, 3049–3052.

Iwaya, M., and Strominger, J.L. (1977). Simultaneous deletion of D-alanine carboxypeptidase IB-C and penicillin-binding component IV in a mutant of *Escherichia coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 2980–2984.

Jain, A., Utey, L., Zabawa, T., Parr, T.R., and Pucci, M.J. (2018). Tebipenem, the first oral carbapenem antibiotic. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 16, 513–522.

Jarick, M., Bertsche, U., Stahl, M., Schultz, D., Methling, K., Lalk, M., Stigloher, C., Steger, M., Schlosser, A., and Ohlsen, K. (2018). The serine/threonine kinase Stk and the phosphatase Stp regulate cell wall synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.* 8, 13693.

Jaurin, B., and Grundstrom, T. (1981). AmpC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of β -lactamases of the penicillinase type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 4897–4901.

Jeong, J.-H., Kim, Y.-S., Rojviriya, C., Ha, S.-C., Kang, B.S., and Kim, Y.-G. (2013). Crystal structures of bifunctional penicillin-binding protein 4 from *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3507–3512.

Ji, C., Juárez-Hernández, R.E., and Miller, M.J. (2012). Exploiting bacterial iron acquisition: siderophore conjugates. *Future Med. Chem.* 4, 297–313.

Joris, B., Ghuysen, J.-M., Dive, G., Renard, A., Dideberg, O., Charlier, P., Frere, J.-M., Kelly, J.A., Boyington, J.C., Moews, P.C., *et al.* (1988). The active-site-serine penicillin-recognizing enzymes as members of the *Streptomyces* R61 DD-peptidase family. *Biochem. J* 250, 313–324.

Kadurugamuwa, J.L., Anwar, H., Brown, M.R.W., Shand, G.H., and Ward, K.H. (1987). Media for study of growth kinetics and envelope properties of iron-deprived bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 25, 849–855.

Kato, K., Shirasaka, Y., Kuraoka, E., Kikuchi, A., Iguchi, M., Suzuki, H., Shibasaki, S.,

- Kurosawa, T., and Tamai, I. (2010). Intestinal absorption mechanism of tebipenem pivoxil, a novel oral carbapenem: involvement of human OATP family in apical membrane transport. *Mol. Pharm.* 7, 1747–1756.
- King, A.M., King, D.T., French, S., Brouillette, E., Asli, A., Alexander, J.A.N., Vuckovic, M., Maiti, S.N., Parr, T.R., Brown, E.D., et al. (2016). Structural and kinetic characterization of diazabicyclooctanes as dual inhibitors of both serine- β -lactamases and penicillin-binding proteins. *ACS Chem. Biol.* 11, 864–868.
- Kirby, W.M.M. (1944). Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science* (80-.). 99, 452–453.
- Knüsel, F., and Nüesch, J. (1965). Mechanism of action of sideromycins. *Nature* 206, 674–676.
- Kobayashi, D., Nozawa, T., Imai, K., Nezu, J.-I., Tsuji, A., and Tamai, I. (2003). Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane. *J Pharmacol Exp Ther* 306, 703–708.
- Kojima, S., and Nikaido, H. (2013). Permeation rates of penicillins indicate that *Escherichia coli* porins function principally as nonspecific channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 2629–2634.
- Korat, B., Mottl, H., and Keck, W. (1991). Penicillin-binding protein 4 of *Escherichia coli*: molecular cloning of the *dacB* gene, controlled overexpression, and alterations in murein composition. *Mol. Microbiol.* 5, 675–684.
- Krajnc, A., Brem, J., Hinchliffe, P., Calvopiña, K., Panduwawala, T.D., Lang, P.A., Kamps, J.J.A.G., Tyrrell, J.M., Widlake, E., Saward, B.G., et al. (2019). Bicyclic boronate VNRX-5133 inhibits metallo- and serine- β -lactamases. *J. Med. Chem.* 62, 8544–8556.
- Lai, G.C., Cho, H., and Bernhardt, T.G. (2017). The mecillinam resistome reveals a role for peptidoglycan endopeptidases in stimulating cell wall synthesis in *Escherichia coli*. *Plos Genet.* 13, 1–22.
- Lapuebla, A., Abdallah, M., Olafisoye, O., Cortes, C., Urban, C., Quale, J., and Landman, D. (2015). Activity of meropenem combined with RPX7009, a novel β -lactamase inhibitor, against Gram-negative clinical isolates in New York city. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 4856–4860.
- Lee, W., McDonough, M.A., Kotra, L.P., Li, Z.-H., Silvaggi, N.R., Takeda, Y., Kelly, J.A., and Mobashery, S. (2001). A snapshot of the final step of bacterial cell wall biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 1427–1431.
- Legaree, B.A., Daniels, K., Weadge, J.T., Cockburn, D., and Clarke, A.J. (2007). Function of penicillin-binding protein 2 in viability and morphology of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 411–424.

- Li, X.-Z., Ma, D., Livermore, D.M., and Nikaido, H. (1994). Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to β -lactam resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 1742–1752.
- Li, X.-Z., Hiroshi Nikaido, and Poole, K. (1995). Role of mexA-mexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1948–1953.
- Li, X.-Z., Plésiat, P., and Nikaido, H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 337–418.
- Lin, Y.M., Ghosh, M., Miller, P.A., Möllmann, U., and Miller, M.J. (2019). Synthetic sideromycins (skepticism and optimism): selective generation of either broad or narrow spectrum Gram-negative antibiotics. *BioMetals* 32, 425–451.
- Lisa, M.-N., Palacios, A.R., Aitha, M., González, M.M., Moreno, D.M., Crowder, M.W., Bonomo, R.A., Spencer, J., Tierney, D.L., Llarrull, L.I., *et al.* (2017). A general reaction mechanism for carbapenem hydrolysis by mononuclear and binuclear metallo- β -lactamases. *Nat. Commun.* 8, 1–11.
- Lister, P.D., Wolter, D.J., and Hanson, N.D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 582–610.
- Liu, R., Miller, P.A., Vakulenko, S.B., Stewart, N.K., Boggess, W.C., and Miller, M.J. (2018). A synthetic dual drug sideromycin induces Gram-negative bacteria to commit suicide with a Gram-positive antibiotic. *J. Med. Chem.* 61, 3845–3854.
- Livermore, D.M. (1995). β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 557–584.
- Livermore, D.M., Warner, M., and Mushtaq, S. (2013). Activity of MK-7655 combined with imipenem against Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 2286–2290.
- Livermore, D.M., Mushtaq, S., Warner, M., Vickers, A., and Woodford, N. (2017). *In vitro* activity of cefepime/zidebactam (WCK 5222) against Gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 1373–1385.
- Lobanovska, M., and Pilla, G. (2017). Penicillin's discovery and antibiotic resistance: Lessons for the future? *Yale J. Biol. Med.* 90, 135–145.
- Lopatkin, A.J., Meredith, H.R., Srimani, J.K., Pfeiffer, C., Durrett, R., and You, L. (2017). Persistence and reversal of plasmid-mediated antibiotic resistance. *Nat. Commun.* 8, 1–10.
- Massova, I., and Mobashery, S. (1998). Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1–17.

Masuda, N., Gotoh, N., Ishii, C., Sakagawa, E., Ohya, S., and Nishino, T. (1999). Interplay between chromosomal β -lactamase and the MexAB-OprM efflux system in intrinsic resistance to β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 400–402.

Matsushashi, M., Takagaki, Y., Maruyama, I.N., Tamaki, S., Nishimura, Y., Suzuki, H., Ogino, U., and Hirota, Y. (1977). Mutants of *Escherichia coli* lacking in highly penicillin-sensitive D-alanine carboxypeptidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 2976–2979.

McHugh, J.P., Rodríguez-Quinones, F., Abdul-Tehrani, H., Svistunenko, D.A., Poole, R.K., Cooper, C.E., and Andrews, S.C. (2003). Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*, a new mechanism for iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* 278, 29478–29486.

Moellering, R.C., Eliopoulos, G.M., and Sentochnik, D.E. (1989). The carbapenems: new broad spectrum β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 24, 1–7.

Mohr, K.I. (2016). History of Antibiotics Research. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 398, 237–272.

Moisan, H., Pruneau, M., and Malouin, F. (2010). Binding of ceftaroline to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 713–716.

Monks, J., and Waley, S.G. (1988). Imipenem as substrate and inhibitor of β -lactamases. *Biochem. J* 253, 323–328.

Müller, A., Klöckner, A., and Schneider, T. (2017). Targeting a cell wall biosynthesis hot spot. *Nat. Prod. Rep.* 34, 909–932.

Nakagawa, J.-I., Tamaki, S., Tomioka, S., and Matsushashi, M. (1984). Functional biosynthesis of cell wall peptidoglycan by polymorphic bifunctional polypeptides. *J. Biol. Chem.* 259, 13937–13946.

Navratna, V., Nadig, S., Sood, V., Prasad, K., Arakere, G., and Gopal, B. (2010). Molecular basis for the role of *Staphylococcus aureus* penicillin-binding protein 4 in antimicrobial resistance. *J. Bacteriol.* 192, 134–144.

Nicholas, R.A., Krings, S., Tomberg, J., George, N., and Davies, C. (2003). Crystal structure of wild-type penicillin-binding protein 5 from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 278, 52826–52833.

Nikaido, H. (1989). Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 1831–1836.

Nikaido, H., Rosenberg, E.Y., and Foulds, J. (1983). Porin channels in *Escherichia coli*: studies with β -Lactams in intact cells. *J. Bacteriol.* 153, 232–240.

Nikaido, H., and Vaara, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability.

Microbiol. Rev. 49, 1–32.

O'Neill, J. (2014). Review on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the Health and Wealth of Nations.

Oliva, M., Dideberg, O., and Field, M.J. (2003). Understanding the acylation mechanisms of active-site serine penicillin-recognizing proteins: A molecular dynamics simulation study. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 53, 88–100.

Orellano, E.G., Girardini, J.E., Cricco, J.A., Ceccarelli, E.A., and Vila, A.J. (1998). Spectroscopic characterization of a binuclear metal site in *Bacillus cereus* β -lactamase II. *Biochemistry* 37, 10173–10180.

Papp-Wallace, K.M. (2019). The latest advances in β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations for the treatment of Gram-negative bacterial infections. *Expert Opin Pharmacother* 20, 2169–2184.

Papp-Wallace, K.M., Bethel, C.R., Distler, A.M., Kasuboski, C., Taracila, M., and Bonomo, R.A. (2010). Inhibitor resistance in the KPC-2 β -lactamase, a preeminent property of this class A β -Lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 890–897.

Papp-Wallace, K.M., Endimiani, A., Taracila, M.A., and Bonomo, R.A. (2011). Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4943–4960.

Pereira, S.F.F., Henriques, A.O., Pinho, M.G., De Lencastre, H., and Tomasz, A. (2007). Role of PBP1 in cell division of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 189, 3525–3531.

Philippon, A., Labia, R., and Jacoby, G. (1989). Extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 1131–1136.

Pinho, M.G., De Lencastre, H., and Tomasz, A. (2001). An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 10886–10891.

Poirel, L., Naas, T., and Nordmann, P. (2010). Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 24–38.

Postle, K., and Larsen, R.A. (2007). TonB-dependent energy transduction between outer and cytoplasmic membranes. *Biometals* 20, 453–465.

Proschak, A., Lubuta, P., Grün, P., Löhr, F., Wilharm, G., De Berardinis, V., and Bode, H.B. (2013). Structure and biosynthesis of fimsbactins A-F, siderophores from *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter baylyi*. *ChemBioChem* 14, 633–638.

Quale, J., Bratu, S., Gupta, J., and Landman, D. (2006). Interplay of efflux system, AmpC, and OprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates.

Antimicrob. Agents Chemother. *50*, 1633–1641.

Raymond, K.N., Müller, G., and Matzanke, B.F. (1984). Complexation of iron by siderophores a review of their solution and structural chemistry and biological function. *Top. Cur. Chem.* *123*, 49–102.

Raymond, K.N., Allred, B.E., and Sia, A.K. (2015). Coordination chemistry of microbial iron transport. *Acc. Chem. Res.* *48*, 2496–2505.

Reading, C., and Cole, M. (1977). Clavulanic acid: a β -lactamase-inhibiting β -lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *11*, 852–857.

Rice, L.B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE. *J. Infect. Dis.* *197*, 1079–1081.

Richmond, M.H., and Sykes, R.B. (1973). The β -lactamases of Gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv. Microb. Physiol.* *9*, 31–88.

Rubio, A., Pucci, M.J., and Jain, A. (2018). Characterization of SPR994, an orally available carbapenem, with activity comparable to intravenously administered carbapenems. *ACS Infect. Dis.* *4*, 1436–1438.

Sauvage, E., and Terrak, M. (2016). Glycosyltransferases and transpeptidases/penicillin-binding proteins: valuable targets for new antibacterials. *Antibiotics* *5*, 1–27.

Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A., and Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* *32*, 234–258.

Schleifer, K.H., and Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* *36*, 407–477.

Schwartz, B., Markwalder, J.A., and Wang, Y. (2001). Lipid II: total synthesis of the bacterial cell wall precursor and utilization as a substrate for glycosyltransfer and transpeptidation by penicillin binding protein (PBP) 1b of *Eschericia coli*. *J. Am. Chem. Soc.* *123*, 11638–11643.

Sheldon, J.R., Laakso, H.A., and Heinrichs, D.E. (2018). Iron Acquisition Strategies of Bacterial Pathogens. *Microbiol Spectr* *4*, doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0010-2015.

Sidell, S., Burdick, R., Brodie, J., Bulger, R., and Kirby, W.M.M. (1963). New Antistaphylococcal Antibiotics. *Arch. Intern. Med.* *112*, 21–28.

Snyder, N.J., Tabas, L.B., Berry, D.M., Duckworth, D.C., Spry, D.O., and Dantzig, A.H. (1997). Structure-activity relationship of carbacephalosporins and cephalosporins: antibacterial activity and interaction with the intestinal proton-dependent dipeptide transport carrier of Caco-2 cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* *41*, 1649–1657.

Spellberg, B., Guidos, R., Gilbert, D., Bradley, J., Boucher, H.W., Scheld, W.M., Bartlett, J.G., and Edwards, J. (2008). The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the infectious diseases society of America. *Clin. Infect. Dis.* 46, 155–164.

Spratt, B.G. (1975). Distinct penicillin-binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72, 2999–3003.

Spratt, B.G., and Cromie, K.D. (1988). Penicillin-binding proteins of Gram-negative bacteria. *Rev. Infect. Dis.* 10, 699–711.

Starbird, C.A., Maklashina, E., Sharma, P., Qualls-Histed, S., Cecchini, G., and Iverson, T.M. (2017). Structural and biochemical analyses reveal insights into covalent flavinylation of the *Escherichia coli* Complex II homolog quinol:fumarate reductase. *J. Biol. Chem* 292, 12921–12933

Stefanska, A.L., Fulston, M., Houge-Frydrych, C.S. V, Jones, J.J., and Warr, S.R. (2000). A potent seryl tRNA synthetase inhibitor SB-217452 isolated from a *Streptomyces* species. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 53, 1346–1353.

Sutaria, D.S., Moya, B., Green, K.B., Kim, T.H., Tao, X., Jiao, Y., Louie, A., Drusano, G.L., and Bulitta, J.B. (2018). First penicillin-binding protein occupancy patterns of β -lactams and β -lactamase inhibitors in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 62, 1–12.

Sutherland, R. (1964). The nature of the insensitivity of Gram-negative bacteria towards penicillins. *J. Gen. Microbiol* 34, 85–98.

Sykes, R.B., Bonner, D.P., Bush, K., and Georgopapadakou, N.H. (1982). Azthreonam (SQ 26,776), a synthetic monobactam specifically active against aerobic Gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21, 85–92.

Talan, D.A., Takhar, S.S., Krishnadasan, A., Abrahamian, F.M., Mower, W.R., and Moran, G.J. (2016). Fluoroquinolone-resistant and extended-spectrum β -lactamase- producing *Escherichia coli* infections in patients with pyelonephritis, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 1594–1603.

Tamai, I., Nakanishi, T., Hayashi, K., Terao, T., Sai, Y., Shiraga, T., Miyamoto, K.-I., Takeda, E., Higashida, H., and Tsuji, A. (1997). The predominant contribution of oligopeptide transporter PepT1 to intestinal absorption of β -lactam antibiotics in the rat small intestine. *J. Pharm. Pharmacol.* 49, 796–801.

Tang, C., Cai, L., Liu, S., Zheng, Z., Li, G., Chen, J., and Sui, Q. (2018). Crystal structure of tebipenem pivoxil. *Acta Cryst.* 74, 1215–1217.

Terrak, M., Ghosh, T.K., van Heijenoort, J., Van Beeumen, J., Lampilas, M., Aszodi, J., Ayala, J.A., Ghuysen, J.-M., and Nguyen-Disteche, M. (1999). The catalytic, glycosyl transferase and

acyl transferase modules of the cell wall peptidoglycan-polymerizing penicillin-binding protein 1b of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 34, 350–364.

Terrak, M., Sauvage, E., Derouaux, A., Dehareng, D., Bouhss, A., Breukink, E., Jeanjean, S., and Nguyen-Distèche, M. (2008). Importance of the conserved residues in the peptidoglycan glycosyltransferase module of the class A penicillin-binding protein 1b of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 283, 28464–28470.

Tipper, D.J., and Strominger, J.L. (1965). Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 54, 1133–1141.

Umbreit, J.N., and Strominger, J.L. (1973). D-alanine carboxypeptidase from *Bacillus subtilis* membranes. *Biol. Chem.* 248, 6767–6771.

Ventola, C.L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *PT* 40, 277–283.

Vollmer, W., Blanot, D., and De Pedro, M.A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 149–167.

Vořšíek, J., and Grünberger, D. (1966). The inhibitory effect of albomycin (Grisein) on growth of *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Folia Microbiol. (Praha)*. 11, 465–471.

Wang, X., Zhang, F., Zhao, C., Wang, Z., Nichols, W.W., Testa, R., Li, H., Chen, H., He, W., Wang, Q., *et al.* (2014). *In vitro* activities of ceftazidime-avibactam and aztreonam-avibactam against 372 gram-negative Bacilli collected in 2011 and 2012 from 11 teaching hospitals in China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 1774–1778.

Watkins, R.R. and Bonomo, R.A. (2017). β -Lactam Antibiotics. In *Infectious Diseases 4e* édition, Cohen J., Powderly, W.,G. and Opal, S.,M. (Elsevier), pp. 1203-1216.e2.

Wencewicz, T.A., and Miller, M.J. (2013). Biscatecholate-monohydroxamate mixed ligand siderophore-carbacephalosporin conjugates are selective sideromycin antibiotics that target *Acinetobacter baumannii*. *J. Med. Chem.* 56, 4044–4052.

Woodmansee, A.N., and Imlay, J.A. (2002). Reduced flavins promote oxidative DNA damage in non-respiring *Escherichia coli* by delivering electrons to intracellular free iron. *J. Biol. Chem.* 277, 34055–34066.

World Bank (2017). Drug-resistant infections: A threat to our economic future. Washington, DC: World Bank.

World health organization (2017). Critically important antimicrobials for human medicine 5th revision. Geneva, World Health Organization, 2017.

Yao, Q., Wang, J., Cui, T., Yang, Z., Su, M., Zhao, P., Yan, H., Zhan, Y., Yang, H., and Mcphee, D.J. (2016). Antibacterial properties of tebipenem Pivoxil tablet, a new oral carbapenem preparation against a variety of pathogenic bacteria *in vitro* and *in vivo*. *Molecules* 21, 1–14.

Zaffiri, L., Gardner, J., and Toledo-Pereyra, L.H. (2012). History of Antibiotics: from salvarsan to cephalosporins. *J. Investig. Surg.* 25, 67–77.

Zapun, A., Contreras-Martel, C., and Vernet, T. (2008). Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 361–385.

Zhanel, G.G., Wiebe, R., Dilay, L., Thomson, K., Rubinstein, E., Hoban, D.J., Noreddin, A.M., and Karlowsky, J.A. (2007). Comparative review of the carbapenems drugs. *Drugs* 67, 1027–1052.

Zhanel, G.G., Lawrence, C.K., Adam, H., Schweizer, F., Zelenitsky, S., Zhanel, M., Lagacé-Wiens, P.R.S., Walkty, A., Denisuk, A., Golden, A., et al. (2017). Imipenem–relebactam and meropenem–vaborbactam: two novel carbapenem- β -lactamase inhibitor combinations. *Drugs* 78, 65–98.

Zhao, G., Meier, T.I., Kahl, S.D., Gee, K.R., and Blaszcak, L.C. (1999). Bocillin FL, a sensitive and commercially available reagent for detection of penicillin-binding proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1124–1128.

Zimmermann, W., and Rosselet, A. (1977). Function of the Outer Membrane of *Escherichia coli* as a permeability barrier to β -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12, 368–372.

